Uniwersytet Warszawski Wydział Matematyki, Informatyki i Mechaniki

Jakub Pękalski

Nr albumu: 249341

Matematyczny model ścieżki regulatorowej NF- κ B z dodatnim sprzężeniem zwrotnym

Praca magisterska

na kierunku MATEMATYKA W RAMACH MIĘDZYWYDZIAŁOWYCH INDYWIDUALNYCH STUDIÓW MATEMATYCZNO-PRZYRODNICZYCH w zakresie MATEMATYKI STOSOWANEJ

> Praca wykonana pod kierunkiem dra hab. Jacka Miękisza Instytut Matematyki Stosowanej i Mechaniki, Uniwersytet Warszawski oraz dra hab. Tomasza Lipniackiego Instytut Podstawowych Problemów Techniki Polskiej Akademii Nauk

> > Warszawa, lipiec 2011

Oświadczenie kierującego pracą

Potwierdzam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i kwalifikuje się do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie tytułu zawodowego.

Data

Podpis kierującego pracą

Oświadczenie autora (autorów) pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca dyplomowa została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem tytułu zawodowego w wyższej uczelni.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Podpis autora (autorów) pracy

Data

Moim promotorom dr hab. Tomaszowi Lipniackiemu oraz dr hab. Jackowi Miękiszowi za pomoc, cierpliwość i inspirację oraz koledze **Pawłowi Żukowi** za niezawodny symulator MC

Dziękuję





UNIA EUROPEJSKA EUROPEJSKI FUNDUSZ ROZWOJU REGIONALNEGO



Niniejsza praca została sfinansowana w ramach Programu Team: TEAM/2009-3/6 Fundacji na rzecz Nauki Polskiej.

Streszczenie

W pracy analizuje matematyczny model ścieżki regulatorowej czynnika transkrypcyjnego $NF\kappa B$. Do zaproponowanego przez Tomasza Lipniackiego i współpracowników (*Nature* 2010) modelu dołączam pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego związanego z wewnątrzkomórkową produkcją ligandu $TNF\alpha$. Po szczegółowym omówieniu rozważanych reakcji oraz uzasadnieniu wprowadzonych modyfikacji przeprowadzam analize bifurkacyjna modelu deterministycznego. Ze względu na wysoka złożoność problemu (układ 24 nieliniowych równań różniczkowych zwyczajnych) ograniczam rozważania do symulacji numerycznych. W dalszej części pracy badam model stochastyczny oparty na teorii procesów Markowa z czasem ciągłym i dyskretną przestrzenią stanów. Analizę tego modelu opieram o symulacje numeryczne przeprowadzone zgodnie z algorytmem Gillespiego (J. Phys. Chem. 1977) omówionym w rozdziale 5. Uzyskane wyniki prowadzą mnie do badania stochastycznych efektów związanych z bistabilnością układu (skoki stochastycznych trajektorii pomiędzy deterministycznymi atraktorami) oraz występującymi w nim oscylacjami (rezonans stochastyczny). W końcowym rozdziale pracy przedstawiam wyniki dopasowania parametrów modelu do danych eksperymentalnych opublikowanych przez grupę M.R. White'a (J. Cell. Sci. 2010). Wyniki te potwierdzają zasadność wprowadzonych w modelu zmian. Są one również podstawą do postawienia hipotezy na temat występowania autoaktywacji wśród innych komórek o wysokiej wewnętrznej produkcji TNF lpha(monocyty, makrofagi).

Słowa kluczowe

układy dynamiczne, bistabilność, proces Markowa, sieci regulatorowe, NF- κB

Dziedzina pracy (kody wg programu Socrates-Erasmus)

11.1 Matematyka

Klasyfikacja tematyczna

60J28 Application of continuous-time Markov processes on discrete state spaces 92C40 Biochemistry, molecular biology 93A30 Mathematical modeling (models od systems, model-matching, etc.)

Tytuł pracy w języku angielskim

Mathematical model of NF- κ B regulatory pathway with positive feedback loop

Spis treści

1.	Wprowadzenie	5
	1.1. Motywacje biologiczne	5
	1.2. Motywacje matematyczne	6
2.	Ścieżka sygnałowa NF- κB	9
	2.1. Opis modelu	9
	2.2. Moduły szlaku sygnałowego NF- κ B	0
3.	Analiza bifurkacyjna modelu	7
	3.1. Bifurkacje kowymiaru 1 prowadzące do oscylacji	7
	3.2. Analiza bifurkacyjna ścieżki regulatorowej $NF-\kappa B$	0
4.	Model stochastyczny 2	5
	4.1. Proces Markowa	5
	4.2. Stochastyczny model ekspresji genu	8
5.	Symulacje numeryczne	1
	5.1. Algorytm Gillespiego	1
	5.2. Stochastyczne efekty	3
6.	Weryfikacja modelu	9
7.	Podsumowanie	3
Bi	bliografia	5

Wprowadzenie

1.1. Motywacje biologiczne

Czynnik transkrypcyjny $NF-\kappa B$

Obiektem badań niniejszej pracy jest szlak sygnałowy czynnika transkrypcyjnego $NF - \kappa B$ (Nuclear Factor kappa-B). Ten kompleks białek odkryty w 1986 roku przez Davida Baltimora występuje we wszystkich typach komórek od muszki owocowej do człowieka. Jest on uznawany za najważniejszy czynnik regulujący ekspresję genów związanych z wczesną odpowiedzią immunologiczną. Gdy $NF - \kappa B$ przyczepia się do obszaru promotora danego genu, wówczas następuje jego aktywacja i rozpoczyna się proces produkcji białka. Stan, w którym $NF - \kappa B$ znajduje się w jądrze komórkowym nie jest stanem stałym. Produkcja białek jest hamowana przez grupę inhibitorów $NF - \kappa B$ (m.in. $I\kappa B\alpha$ i A20), które wpływają na odłączenie $NF - \kappa B$ od genu i jego powrót do cytoplazmy. Będziemy mówić, że komórka jest aktywna, gdy poziom $NF - \kappa B$ w jądrze zmienia się w sposób oscylujący natomiast nieaktywna, gdy większość molekuł $NF - \kappa B$ znajduje się poza jądrem komórkowym. $NF - \kappa B$ jest czynnikiem transkrypcyjnym dla kilkuset genów. Aktywacja czynnika $NF - \kappa B$ prowadzi do aktywacji genów odpowiadających za zapalenie, proliferację, odpowiedź antywirusową oraz antyapoptotyczną. $NF - \kappa B$ może być aktywowany na dwa sposoby:

- przez sygnał pochodzący z innych komórek wydzielających cytokiny takie jak TNFα czy Interleukina 1 (IL-1), przyłączające się do receptorów typu TNFR1, IL-R;
- poprzez bezpośrednie oddziaływanie z patogenami (bakteriami, wirusami) bądź ich produktami (np. fragmentami błony komórkowej, dwuniciowym RNA).

Ze względu właśnie na aktywację $NF - \kappa B$ fizjologicznymi dawkami $TNF \alpha$ pochodzącymi od pobliskich komórek, w dalszej części pracy będziemy badać odpowiedź na zewnętrzny sygnał $TNF \alpha$ rzędu kilkudziesięciu pg/ml (10⁻⁹ gram/litr).

Rola $NF-\kappa B$ w komórkach nowotworowych

Ligand $TNF\alpha$ jest najlepiej dotąd poznanym czynnikiem prowadzącym do apoptozy komórek. Apoptoza indukowana przez $TNF\alpha$ jest kontrolowana przez funkcjonowanie modułu regulatorowego NF- κB . Komórki rakowe mają podwyższony poziom NF- κB co, ze względu na antyapoptotyczną rolę NF- κB , utrudnia chemio- i radioterapię. Zablokowanie ścieżki przekazu sygnału pomiędzy receptorem $TNF\alpha$ (TNFR1) a czynnikiem transkrypcyjnym NF- κB wraz z jednoczesną stymulacją komórek $TNF\alpha$ pozwoliłoby wprowadzić komórkę rakową na ścieżkę apoptozy. Dokładne poznanie szlaku sygnałowego $NF-\kappa B$ jest więc istotne nie tylko ze względu na jego kluczową rolę procesie obrony immunologicznej, ale również ze względu na jego antyapoptotyczne działanie w komórkach nowotworów.

Badania opublikowane w 2010 roku przez grupę M.R. White'a [16] nad komórkami rakowymi typu SK-N-AS¹ pokazały, iż aktywacja komórki zależy od poziomu zewnętrznego sygnału $TNF\alpha$. Przy czym blisko 100% populacji badanych komórek aktywuje się już przy dawce 100 pg/ml podczas ciągłej stymulacji. Co ciekawe, okazało się również, że blisko 20% ich populacji doznaje samoaktywacji (bez zewnętrznej stymulacji). W dalszej części pracy pokażę, iż takie zachowanie może być efektem istniejącego w tego typu komórkach dodatniego sprzężenia zwrotnego NF- κB związanego z wewnętrzną produkcją $TNF\alpha$. Stawiam również hipotezę, iż podobne zachowanie może być obserwowane w przypadku innych komórek o podwyższonej wewnętrznej produkcji $TNF\alpha$ (monocyty, makrofagi).

1.2. Motywacje matematyczne

Podstawowym narzędziem służącym modelowaniu szlaków sygnałowych jest układ równań różniczkowych zwyczajnych. Opisując stężenia kolejnych białek biorących udział w przekazywaniu sygnału w głąb komórki poprzez nowe zmienne korzysta się z założenia o ich ciągłości. Jednak gdy przychodzi nam opisać np. stan genu, który może być tylko aktywny bądź nieaktywny lub procesy w których uczestniczy niewielka liczba molekuł, wydaje się to być założeniem nieuzasadnionym. Wówczas do opisu zachodzących reakcji stosuje się teorię procesów Markowa z dyskretną przestrzenią stanów. Do ogólnej analizy zachowań naszego modelu w przypadku deterministycznym korzysta się z bogatej teorii jakościowej równań różniczkowych. Jednak nawet podstawowe pojęcia tam występujące takie jak punkt stacjonarny czy cykl graniczny w teorii procesów stochastycznych nie mają swoich ścisłych analogów. Pojawia się więc pytanie, jakie są podobieństwa, a jakie są różnice w zachowaniach trajektorii deterministycznych i stochastycznych.

Intuicja sugerująca, iż model ciągły jest dobrym przybliżeniem średniej ze stochastycznych trajektorii jest dla bistabilnych modeli całkowicie błędna. W przypadku, gdy w układzie mamy do czynienia z dwoma atraktorami, trajektorie potrafią pod wpływem występującej w modelu stochastyczności przeskakiwać pomiędzy obszarami, które w modelu ciągłym były basenami przyciągania atraktorów. Uśrednienie takiego zachowania w czasie mogłoby doprowadzić do mylnego wrażenia, że w modelu deterministycznym mamy do czynienia tylko z jednym stanem stabilnym.

W pracy, korzystając z teorii bifurkacji kowymiaru 1, przedstawię opartą o numeryczne symulacje analizę bifurkacyjną deterministycznego modelu szlaku sygnałowego $NF-\kappa B$. Korzystając z teorii procesów Markowa z czasem ciągłym i dyskretną przestrzenią stanów przejdę przy pomocy algorytmu Gillespiego do symulacji modelu stochastycznego. Występująca w tym modelu bistabilność, spowodowana współistnieniem stabilnego punktu stacjonarnego oraz cyklu granicznego, doprowadzi mnie do analizy dwojakiego rodzaju efektów stochastycznych. Pierwszy z nich związany jest ze skokami stochastycznych trajektorii pomiędzy obszarami odpowiadającymi basenom przyciągania atraktorów modelu ciągłego. Drugi natomiast, zwany rezonansem stochastycznym, skutkuje pojawieniem się stochastycznych oscylacji dla takiego zakresu parametru bifurkacyjnego, dla którego w modelu deterministycznym cyklu granicznego nie ma.

To właśnie dzięki tym czysto stochastycznym zachowaniom, niemożliwym do osiągnięcia

¹Komórki SK-N-AS to komórki nowotworowe neuroblastomy (nerwiaka płodowego). Komórki nowotworowe są często używane w eksperymentach przede wszystkim z powodu ich wysokiej przeżywalności

w modelach ciągłych, w ostatnim rozdziale pracy udało mi się dopasować nasz model ścieżki sygnałowej do danych eksperymentalnych.

Ścieżka sygnałowa NF- κB

Procesy zachodzące w komórce są kontrolowane przez szlaki sygnałowe (moduły regulatorowe), czyli ciągi aktywacji i dezaktywacji kolejnych białek mające na celu wytworzenie odpowiedzi na zewnętrzną stymulację. Głównym obiektem badań mojej pracy jest szlak sygnałowy czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (Nuclear Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells), którego model stworzony przez Tomasza Lipniackiego i współpracowników, [15] szczegółowo omówię w tym rozdziale.

2.1. Opis modelu

Poniższe równania $(2.1-2.24)^1$ stanowią autonomiczny układ równań różniczkowych zwyczajnych opisujący odpowiedź rakowej komórki eukariotycznej na zewnętrzną stymulację. Jest to model opublikowany w 2010 roku w Nature [15], zmodyfikowany o dodanie dodatniego sprzężenia zwrotnego związanego z $TNF\alpha$. Schemat opisywanych reakcji został przedstawiony na rysunku 2.1. Uwzględnione w modelu sprzężenia zwrotne przedstawia schematycznie rysunek 2.2.

¹Przy zapisie równań została zastosowana następująca konwencja: \dot{x} oznacza pochodną zmiennej x względem czasu. Współczynniki równań zostały zapisane małymi arabskimi literami, za wyjątkiem λ opisującej szybkość transkrypcji $TNF\alpha$.

$$TN\dot{F}\alpha_{ext} = -T_{deg} \cdot TNF\alpha_{ext} \tag{2.1}$$

$$\dot{R_{act}} = TNF\alpha_{int} \cdot \frac{c_{sec} \cdot (M - R_{act})}{(M - R_{act}) + c_b} + k_b \cdot TNF\alpha_{ext} \cdot (M - R_{act}) - k_f \cdot R_{act} \quad (2.2)$$

$$IK\dot{K}K_a = k_a \cdot R_{act} \cdot (IKKK_n) \cdot \frac{k_{A20}}{k_{A20} + k_{AB} \cdot A20} - k_i \cdot IKKK_a$$
(2.3)

$$IK\dot{K}K_n = -k_a \cdot R_{act} \cdot (IKKK_n) \cdot \frac{\kappa_{A20}}{k_{A20} + k_{AB} \cdot A20} + k_i \cdot IKKK_a$$
(2.4)

$$I\dot{KK}_n = -k_1 \cdot IKKK_a^2 \cdot IKK_n + k_4 \cdot IKK_{ii}$$
(2.5)

$$I\dot{K}K_a = k_1 \cdot IKKK_a^2 \cdot IKK_n - \frac{\kappa_3}{k_2} \cdot IKK_a \cdot A20 - k_3 \cdot IKK_a$$
(2.6)

$$I\dot{K}K_i = \frac{k_3}{k_2} \cdot IKK_a \cdot A20 + k_3 \cdot IKK_a - k_4 \cdot IKK_i$$
(2.7)

$$IKK_{ii} = k_4 \cdot IKK_i - k_4 \cdot IKK_{ii} \tag{2.8}$$

$$I\kappa \dot{B}\alpha_{ph} = a_2 \cdot IKK_a \cdot I\kappa B\alpha_{cyt} - t_p \cdot I\kappa B\alpha_{ph}$$
(2.9)

$$(I\kappa B\alpha_{ph}|NF-\kappa B)_{cyt} = a_3 \cdot IKK_a \cdot (I\kappa B\alpha|NF-\kappa B)_{cyt} - t_p \cdot (I\kappa B\alpha_{ph}|NF-\kappa B)_{cyt} \quad (2.10)$$

$$NF-\kappa B_{cut} = c_{6a} \cdot (I\kappa B\alpha|NF-\kappa B)_{cut} - a_1 \cdot NF-\kappa B_{cut} \cdot I\kappa B\alpha_{cut} +$$

$$t_p \cdot (I\kappa B\alpha_{ph}|NF - \kappa B)_{cyt} - i_1 \cdot NF - \kappa B_{cyt}$$

$$(2.11)$$

$$NF - \kappa B_{nuc} = i_1 \cdot NF - \kappa B_{cyt} - a_1 \cdot k_v \cdot I \kappa B \alpha_{nuc} \cdot NF - \kappa B_{nuc}$$
(2.12)

$$A20 = c_4 \cdot A20_t - c_5 \cdot A20$$

$$A20_t = c_1 \cdot G_{A20} - c_3 A20_t$$
(2.13)
(2.14)
(2.14)

$$20_t = c_1 \cdot G_{A20} - c_3 A20_t \tag{2.14}$$

$$I\kappa B\alpha_{cyt} = -a_2 \cdot IKK_a \cdot I\kappa B\alpha_{cyt} - a_1 \cdot I\kappa B\alpha_{cyt} \cdot NF - \kappa B_{cyt} + c_4 \cdot I\kappa B\alpha_t$$

$$-c_{5a} \cdot I\kappa B\alpha_{cyt} - \imath_{1a}I\kappa B\alpha_{cyt} + e_{1a} \cdot I\kappa B\alpha_{nuc} \tag{2.15}$$

$$I\kappa B\alpha_{nuc} = -a_1 \cdot k_v \cdot I\kappa B\alpha_{nuc} \cdot NF \kappa B_{cyt} + i_{1a} \cdot I\kappa B\alpha_{cyt} - e_{1a} \cdot I\kappa B\alpha_{nuc} \quad (2.16)$$

$$I\kappa B\alpha_t = c_{1a} \cdot G_{I\kappa B\alpha} - c_3 \cdot I\kappa B\alpha_t \tag{2.17}$$

$$(I\kappa B\alpha | NF-\kappa B)_{cyt} = a_1 \cdot I\kappa B\alpha_{cyt} \cdot NF-\kappa B_{cyt} - c_{6a} \cdot (I\kappa B\alpha | NF-\kappa B)_{cyt} - a_3 \cdot IKK_a \cdot (I\kappa B\alpha | NF-\kappa B)_{cyt} + e_{2a} \cdot (I\kappa B\alpha | NF-\kappa B)_{nuc}$$
(2.18)

$$I\kappa B\alpha | \dot{NF} - \kappa B \rangle_{nuc} = -a_1 \cdot kv \cdot I\kappa B\alpha_{nuc} \cdot NF - \kappa B_{nuc} - e_{2a} \cdot (I\kappa B\alpha | NF - \kappa B)_{nuc}$$
(2.19)

$$T\dot{NF}\alpha_t = \lambda \cdot G_{TNF\alpha} - c_3 \cdot TNF\alpha_t \tag{2.20}$$

$$TN\dot{F}\alpha_{int} = c_{4t} \cdot TNF\alpha_t - c_{5t} \cdot TNF\alpha_{int} - c_{sec} \cdot TNF\alpha_{int}$$
(2.21)

$$G_{A20} = q_1 \cdot NF \kappa B_{nuc} \cdot (AN - G_{A20}) - q_2 \cdot I \kappa B \alpha_{nuc} \cdot G_{A20}$$
(2.22)

$$G_{I\kappa B\alpha} = q_1 \cdot NF - \kappa B_{nuc} \cdot (ANa - G_{I\kappa B\alpha}) - q_2 \cdot I\kappa B\alpha_{nuc} \cdot G_{I\kappa B\alpha}$$
(2.23)

$$G_{TNF\alpha} = q_{1t} \cdot NF - \kappa B_{nuc} \cdot (ANT - G_{TNF\alpha}) - (q_{2tt} + q_2 I \kappa B \alpha_{nuc}) \cdot G_{TNF\alpha} \quad (2.24)$$

2.2. Moduły szlaku sygnałowego NF- κB

Aktywacja i dezaktywacja receptorów

Zewnętrznym sygnałem stymulującym komórkę w naszym modelu jest ligand Tumor Necrosis Factor alpha $(TNF\alpha_{ext})$. Parametry modelu są tak dopasowane, by trajektorie w sposób ilościowy opisywały reakcje pojedynczej komórki na stymulacje stężeniem $TNF\alpha_{ext}$ rzędu



Rysunek 2.1: Schemat modelu szlaku sygnałowego czynnika transkrypcyjnego $NF-\kappa B$.



Rysunek 2.2: Schemat uwzględnionych w modelu sprzężeń zwrotnych.

kilkuset pq/ml. Jego obecność w pobliżu komórki jest wyłapywana poprzez znajdujące się na błonie komórkowej receptory. Całkowita liczba receptorów, (M) nawet dla komórek tego samego typu nowotworu może być różna, dlatego w modelu dla każdej komórki przed symulacją ten parametr jest losowany. Zakładamy wówczas, tak jak w [15] log-normalny rozkład liczby receptorów. Parametry tego rozkładu zostały dopasowane do wyników eksperymentów opublikowanych w [16]. Proces aktywacji receptorów w wyniku przyłączenia $TNF\alpha_{ext}$ do nieaktywnych receptorów opisany jest w równaniu 2.2. W równaniu tym współczynnik szybkości aktywacji receptorów przez pochodzący z zewnętrznej stymulacji $TNF\alpha_{ext}$ został oznaczony przez k_b . Reakcja ta jest biliniowa, gdyż zakładamy, że przy zewnętrznej stymulacji wszystkie molekuły $TNF\alpha_{ext}$ są przez nieaktywne receptory wyłapywane lub równoważnie, że w trakcie zewnętrznej stymulacji (trwającej tylko kilka minut) ilość podawanego $TNF\alpha_{ext}$ jest bardzo duża. Przy długookresowych symulacjach postać tego członu równania 2.2 nie ma znaczenia, gdyż dla odpowiednio dużych czasów symulacji $TNF\alpha_{ext} = 0$. Dezaktywacja receptorów następuje samoistnie ze stałą szybkością reakcji k_f . Człon równania 2.2 odpowiadający aktywacji receptorów przez pochodzący z wnętrza komórki $TNF\alpha_{int}$ omówiony jest w części poświęconej dodatniemu sprzężeniu zwrotnemu.

Kaskada sygnałowa

Aktywacja receptorów powoduje przekazanie sygnału do wnętrza komórki poprzez trójstopniową kaskadę sygnałową składająca się z kinaz *IKKK* oraz *IKK*.

Zakładamy, że białko IKKK może przyjmować dwie formy: aktywną $IKKK_a$ oraz neutralną $IKKK_n$. Przyjmuje się, że $IKKK_n$ jest aktywowane, gdy znajduje się w pobliżu aktywnego receptora R_{act} i reakcja ta zachodzi z szybkością k_a (2.3, 2.4), natomiast współczynnik dezaktywacji jest stale równy k_i .

Dalszym etapem przekazywania sygnału jest aktywacja molekuł białka IKK, które może przyjmować już nie dwie, ale 4 formy: IKK_a , IKK_n , IKK_i , IKK_{ii} . Zakładamy za [1], że forma aktywna IKK_a powstaje z neutralnej IKK_n poprzez fosforylację dwóch cząsteczek $IKKK_a$ - stąd w równaniach (2.6) oraz (2.5) kwadratowa zależność od stężenia $IKKK_a$. Forma nieaktywna IKK_i powstaje z IKK_a poprzez nadmierną fosforylację (2.7), natomiast IKK_{ii} pełni rolę formy przejściowej pomiędzy IKK_i a IKK_n (2.5) powodując swoją obecnością opóźnienie w procesie aktywacji białka IKK. W modelu zakładamy, że łączna liczba molekuł wszystkich form IKK, podobnie jak IKKK, jest stała w czasie - w rzeczywistości oczywiście białka te degradują, jednak zakładamy, że ich produkcja jest równie szybka, co pozwala te procesy w równaniach zaniedbać.

Kaskada sygnałowa prowadząca od aktywnych receptorów kończy się degradacją białka $I\kappa B\alpha_{cyt}$ wskutek oddziaływania z aktywną kinazą IKK_a (2.15).

Aktywacja i dezaktywacja genów

Proces tworzenia nowych białek w komórce eukariotycznej rozpoczyna się w jądrze, gdzie znajduje się DNA. $NF\kappa B$ jako czynnik transkrypcyjny rozpoczyna ten proces dla wielu białek, między innymi dla rozpatrywanych przez nas: A20, $I\kappa B\alpha$ oraz $TNF\alpha$. W modelu zakładamy, że gen może przyjmować jeden z dwóch stanów: aktywny bądź nieaktywny. Gen staje się aktywny, gdy czynnik transkrypcyjny zwiąże się z DNA na obszarze promotora. Dezaktywacja natomiast następuje wskutek pojawienia się w jądrze komórkowym $I\kappa B\alpha_{nuc}$, które wiążąc się z $NF-\kappa B_{nuc}$ odłącza je od obszaru promotora i tym samym zatrzymuje produkcję transkryptu.

Moduł opisujący proces aktywacji i dezaktywacji genów ze względu na biologicznie uzasadnione założenie, iż gen może przyjmować tylko dwa stany (0 - gdy jest nieaktywny, 1 - gdy jest aktywny) najlepiej jest opisywać jako stochastyczny proces Markowa z ciągłym czasem, ale dyskretną przestrzenią stanów. Takie podejście szczegółowo omawiam w rozdziale czwartym. W modelu deterministycznym zmuszeni jesteśmy do ciągłego przybliżenia tego procesu. Rozpatrujemy wówczas przyjmującą wartości z przedziału [0,1] zmienną opisująca częstość przebywania genu w stanach 0 i 1.

Proces aktywacji i dezaktywacji genów w modelu ciągłym opisują równania (2.22), (2.23) i (2.24). Występujące w tych równaniach stałe AN, ANa oraz ANT oznaczają liczbę kopii genu znajdującego się w jądrze komórkowym odpowiednio dla A20, $I\kappa B\alpha$, $TNF\alpha$. W modelu założono, że każdy z genów posiada dwie niezależnie aktywowane kopie. Jeśli jedna kopia G^i (i = 1, 2) przyjmuje wartości z przedziału [0, 1], to zmienna opisująca stan zależnych od $NF-\kappa B$ genów $G = G^1 + G^2$ może przyjmować wartości z przedziału [0, 2].

Pomimo braku eksperymentalnych przesłanek, by ograniczyć liczbę parametrów modelu założono, iż współczynniki aktywacji i dezaktywacji genów dla A20, $I\kappa B\alpha$ są takie same. W przypadku $TNF\alpha$ wprowadziliśmy w równaniu (2.24) dodatkowo (za [11]) możliwość spontanicznego odczepienia NF- κB od genu ze stałą szybkością q_{2tt} .

Należy zwrócić uwagę, iż czynnik transkrypcyjny nie ma wpływu na szybkość transkrypcji, a jedynie na rozpoczęcie tego procesu lub jego zakończenie w momencie odczepienia od promotora genu.

Pętle ujemnego sprzężenia

W modelu ścieżki sygnałowej $N\!F\!\kappa B$ zostały uwzględnione dwie pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego.

(1) Pierwsza związana jest z produkcją białka A20. W modelu przyjęliśmy, że A20 jako inhibitor $NF-\kappa B$ hamuje przekazywanie aktywującego sygnału w głąb komórki na dwóch różnych etapach:

- tłumi sygnał od aktywnych receptorów,
- wpływa na dezaktywacje kinazy IKK.

W równaniu (2.3) za [17] uwzględniony został wpływ A20 na aktywację kinazy IKKK. Dokładny mechanizm tej reakcji nie jest jeszcze znany, wiemy jedynie, że A20 tłumi sygnał przekazywany od aktywnych receptorów, natomiast nie ma wpływu na ich aktywację. Reakcje opisujące wpływ A20 na proces dezaktywacji kinazy IKK zostały uwzględnione w równaniach (2.6) i (2.7).

(2) Druga pętla ujemnego sprzężenia, która została przez nas uwzględniona jest związana z $I\kappa B\alpha$. Schemat składających się na nią reakcji przedstawia rysunek 2.3. $I\kappa B\alpha$ oddziałuje z $NF-\kappa B$ łącząc się z nim w kompleks na dwóch etapach ścieżki sygnałowej.

- w cytoplazmie hamując przez to translokację $NF \kappa B_{cyt}$ do jądra komórkowego,
- w jądrze komórkowym powodując odłączenie $NF-\kappa B_{nuc}$ od promotora.

 $NF-\kappa B_{cyt}$ może przejść z cytoplazmy do jądra tylko, gdy nie jest związane z $I\kappa B\alpha_{cyt}$. W obszarze cytoplazmy $I\kappa B\alpha_{cyt}$ łączy się z $NF-\kappa B_{cyt}$ tworząc kompleks $(I\kappa B\alpha|NF-\kappa B)_{cyt}$. Kompleks ten może się rozpaść samoistnie w tej postaci lub dopiero po sfosforylowaniu $I\kappa B\alpha_{cyt}$. Uwolnione $NF-\kappa B_{cyt}$ przedostaje się do jądra komórkowego. W jądrze $NF-\kappa B_{nuc}$ aktywuje transkrypcję genu $I\kappa B\alpha$, która zostaje przerwana, gdy do $NF-\kappa B_{nuc}$ przyłączy się $I\kappa B\alpha_{nuc}$.



Rysunek 2.3: Schemat modelu pętli ujemnego sprzężenia związanego z $I\kappa\!B\alpha.$

Pętla dodatniego sprzężenia

Uwzględnienie w strukturze ścieżki sygnałowej $NF\kappa B$ pętli dodatniego sprzężenia związanej z $TNF\alpha$ jest modyfikacją, która odróżnia nasz model od do tej pory istniejących. Motywacją do tej zmiany były pojawiające się wyniki eksperymentów na komórkach SK-N-AS (neuroblastomy) [16], których spontaniczna samoaktywacja wskazywała na istnienie właśnie takiego sprzężenia. Reakcje opisujące dodatnie sprzężenie zwrotne zostały uwzględnione w równaniach (2.2), (2.20), (2.21) oraz (2.24). Na rysunku 2.1 zostały one oznaczone czerwonym kolorem jako nowo dodane w stosunku do modelu z [15]. Rozpoczynając od aktywacji genu $TNF\alpha$, kolejne czerwone strzałki na rys. 2.1 przedstawiają uwzględnione przez nas procesy:

- transkrypcji $TNF\alpha_t$,
- transportu z jądra komórkowego do cytoplazmy oraz translacji $T\!N\!F\alpha,$
- aktywacji własnych receptorów na membranie przez $TNF\alpha$ wydzielany na zewnątrz komórki (prawa strzałka)
- aktywacji receptorów pobliskich komórek prze
z $TNF\alpha$ wydzielany na zewnątrz (lewa strzałka)

W modelu wpływ $TNF\alpha_{int}$ na aktywacje receptorów opisuje równanie (2.2), w którym $TNF\alpha_{int} \cdot c_{sec}$ oznacza ilość $TNF\alpha$ wydzielanego przez komórkę w trakcie sekundy. Natomiast $\frac{(M-R_{act})}{(M-R_{act})+c_b}$ to ta część wydzielonego z komórki $TNF\alpha$, która jest wyłapywana przez nieaktywne receptory komórki. Zauważmy, że

$$\frac{(M - R_{act})}{(M - R_{act}) + c_b} < 1, \tag{2.25}$$

czyli nieaktywne receptory nie wyłapują wszystkich molekuły $TNF\alpha$ - część z nich może aktywować komórki znajdujące się w pobliżu². Taka postać równania (2.2) odpowiadającego za autoaktywację komórki, w odróżnieniu od biliniowej postaci stymulacji zewnętrznej, została przyjęta ze względu na małe (fizjologiczne, rzędu kilkudziesięciu pg/ml) dawki $TNF\alpha_{int}$ występujące w przypadku długookresowych symulacji życia komórki.

W dalszej części pracy, traktując współczynnik szybkości transkrypcji λ jako parametr bifurkacyjny, będę badał jaki wpływ na jakościowe zachowanie modelu ma uwzględnienie powyższego sprzężenia.

 $^{^2 {\}rm Proces}$ wzajemnej aktywacji sąsiadujących ze sobą komórek nie został w naszym modelu uwzględniony, jest on jednak ważnym czynnikiem, który warto zanalizować w kolejnych jego modyfikacjach.

Analiza bifurkacyjna modelu

W tym rozdziale przedstawię wyniki analizy bifurkacyjnej deterministycznego modelu ścieżki sygnałowej $NF \kappa B$. Ze względów interpretacyjnych najbardziej interesujące są dla nas występujące w układzie atraktory. Dokładając do istniejących już w układzie ujemnych sprzężeń zwrotnych sprzężenie dodatnie mieliśmy nadzieję, że w układzie pojawi się stabilny cykl graniczny. Jego współistnienie ze stabilnym punktem stałym wskazywałoby na możliwość stałej aktywacji komórki w przypadku modelu deterministycznego, natomiast nietrwałej samoaktywacji w przypadku modelu stochastycznego. By zweryfikować nasze przypuszczenia przeprowadzona została przy pomocy numerycznych symulacji analiza bifurkacyjna układu. W poniższym paragrafie na podstawie [6], [18] oraz [19] przybliżam teorię bifurkacji kowymiaru 1, która pozwoliła mi stwierdzić, w wyniku jakiej bifurkacji narodził się w naszym układzie cykl graniczny.

3.1. Bifurkacje kowymiaru 1 prowadzące do oscylacji

Gdy portret fazowy układu równań różniczkowych jest stabilny względem zaburzeń parametrów w nim występujących mówimy, że układ jest strukturalnie stabilny, w przeciwnym wypadku w układzie zachodzą bifurkacje. Spośród bifurkacji kowymiaru 1, to znaczy bifurkacji powstałych w wyniku zaburzenia tylko jednego z parametrów, można wyróżnić bifurkacje prowadzące w układzie do oscylacji. Na rysunku 3.1 (za [18]) przedstawione zostało zestawienie czterech głównych typów bifurkacji dla układu równań różniczkowych.

Nadkrytyczna bifurkacja Hopfa

Nadkrytyczna bifurkacja Hopfa (nazywana również bifurkacją Andronova-Hopfa lub bifurkacją narodzin cyklu granicznego) jest przykładem bifurkacji lokalnej, tzn. zachodzącej w otoczeniu punktu osobliwego. Analitycznie warunkiem jej wystąpienia jest, by dla bifurkacyjnej wartości parametru zlinearyzowany układ posiadał jedną parę sprzężonych, niezerowych, czysto urojonych wartości własnych: $\lambda_1 = \bar{\lambda_2} = i\omega \in i\mathbb{R}$ i $Re\lambda_j \neq 0$ dla j > 2 oraz $\frac{\partial}{\partial \mu}Re\lambda_{1,2}(\mu)|_{\mu=0} < 0$. Jakościowo natomiast bifurkacja ta wyróżnia się narodzinami stabilnego cyklu granicznego z zerową amplitudą i skończonym niezerowym okresem w punkcie bifurkacji. Równocześnie stabilny punkt, który dał początek temu cyklowi traci swoją stabilność.



(a) Bifurkacja siodło węzeł dla orbity okresowej.



(b) Bifurkacja nadkrytyczna Hopfa.



(c) Bifurkacja podkrytyczna Hopfa.



(d) Bifurkacja siodło węzeł na cyklu niezmienniczym.



(e) Bifurkacja homokliniczna.

Rysunek 3.1: Bifurkacje kowynataru 1 prowadzące do oscylacji.

Podkrytyczna bifurkacja Hopfa

Podkrytyczna bifurkacja Hopfa jest lokalną bifurkacją narodzin niestabilnego cyklu granicznego. Analityczne warunki jej wystąpienia są analogiczne do bifurkacji nadkrytycznej, tzn. $\lambda_1 = \bar{\lambda_2} = i\omega \in i\mathbb{R}$ i $Re\lambda_j \neq 0$ dla j > 2, z tą różnicą, że $\frac{\partial}{\partial\mu}Re\lambda_{1,2}(\mu)|_{\mu=0} > 0$. Jakościowo bifurkacja ta polega na utracie stabilności przez stabilny punkt stacjonarny w wyniku scalenia z zanikającym niestabilnym cyklem granicznym.

Bifurkacja siodło-węzeł

Bifurkacja siodło-węzeł nie prowadzi do powstania w układzie zamkniętej orbity, stanowi ona jednak podstawę do zrozumienia sytuacji analogicznych zachodzących dla cykli granicznych. Bifurkacja siodło-węzeł jest przykładem bifurkacji lokalnej. Analitycznym warunkiem jej wystąpienia jest by zlinearyzowany w punkcie bifurkacyjnym układ posiadał jedną zerową wartość własną, natomiast pozostałe wartości własne powinny mieć niezerowe części rzeczywiste: $\lambda_1 = 0$ i $Re\lambda_j \neq 0$ dla j > 1. Jakościowo bifurkacja ta polega na wzajemnym zniesieniu się punktu siodłowego i węzłowego, które w punkcie bifurkacyjnym tworzą tzw. siodło-węzeł, a następnie anihilują.

Bifurkacja siodło-węzeł dla orbity okresowej (Cyclic Fold)

Bardzo często w pobliżu podkrytycznej bifurkacji Hopfa występuje bifurkacja, w wyniku której nowopowstały niestabilny cykl graniczny zanika. Bifurkacja siodło węzeł dla orbity okresowej jest przykładem bifurkacji nielokalnej, dlatego też analityczny warunek na jej wystąpienie opiera się na przekształceniu powrotu Poincarego. Mianowicie do jej wystąpienia potrzeba, by jedna z wartości własnych liniowej części przekształcenia powrotu dla wartości bifurkacyjnej parametru była równa 1: $\lambda_1 = 1$ i $|\lambda_j| \neq 1$ dla j > 1. Jakościowo bifurkacja ta polega na wzajemnym zniesieniu się dwóch cykli granicznych: stabilnego i niestabilnego, które dla wartości bifurkacyjnej parametru w przekroju Poincarego tworzą siodło-węzeł.

Bifurkacja siodło węzeł na cyklu niezmienniczym

Jeśli dwa punkty stacjonarne siodło i stabilny węzeł są połączone dwiema heteroklinicznym orbitami, wówczas punkty te mogą znieść się wzajemnie poprzez bifurkację siodło-węzeł na cyklu niezminniczym. Rezultatem tej bifurkacji jest cykl stabilny, który w punkcie bifurkacyjnym posiada na swojej orbicie punkt siodłowy (pojawia się orbita homokliniczna). Cechą charakterystyczną dla tego typu bifurkacji są więc narodziny stabilnego cyklu o skończonej niezerowej amplitudzie i nieskończonym okresie.

Bifurkacja homokliniczna

W bifurkacji homoklinicznej punkt siodłowy łączy się z niestabilnym punktem stacjonarnym tworząc w punkcie bifurkacyjnym homokliniczną orbitę, a następnie stabilny cykl graniczny. Podobnie więc jak w bifurkacji siodło węzeł na cyklu niezmienniczym mamy doczynienia ze stabilnym cyklem o nieskończonym okresie i skończonej amplitudzie, jednak w tym wypadku w układzie przed pojawieniem się cyklu nie ma atraktorów.

3.2. Analiza bifurkacyjna ścieżki regulatorowej $NF-\kappa B$

Głównym celem mojej pracy jest ustalenie, jaki wpływ na jakościowe zachowanie modelu ścieżki sygnałowej $NF_{-\kappa}B$ ma dołączenie do niego dodatniego sprzężenia zwrotnego związanego z produkcją w jądrze komórki ligandu $TNF\alpha$. Jako parametr regulujący siłę tego sprzężenia wybraliśmy λ , współczynnik szybkości transkrypcji $TNF\alpha$. Badając więc numerycznie, jaki wpływ na zmianę portretu fazowego układu ma zmiana parametru λ , uzyskałem portret bifurkacyjny modelu.

Wyniki analizy

Rysunek 3.2 przedstawia wyniki analizy bifurkacyjnej naszego modelu ścieżki regulatorowej czynnika transkrypcyjnego $NF-\kappa B$. Do przedstawienia wyników wybrane zostały cztery najważniejsze w modelu zmienne: frakcja jądrowa $NF-\kappa B_{nuc}$ oraz odpowiedzialne ze sprzężenia zwrotne: $I\kappa B\alpha_{cyt}$, A20 i $TNF\alpha$.

Powyższe portrety są wynikiem numerycznych symulacjach modelu. Weryfikacja hipotez co do występujących w modelu bifurkacji przebiegała następująco:

1) Poprzez losowe wybieranie warunków początkowych zostały znalezione występujące w układzie atraktory. Okazało się, że wraz ze wzrostem wartości parametru bifurkacyjnego w układzie możemy zaobserwować kolejno:

- monostabilność związana z istnieniem stabilnego punktu stacjonarnego ($\lambda \in [0, \lambda_1)$);
- bistabilność w wyniku koegzystencji stabilnego punktu stacjonarnego oraz stabilnego cyklu granicznego ($\lambda \in [\lambda_1, \lambda_2]$);
- monostabilność związaną ze stabilnym cyklem granicznym ($\lambda \in (\lambda_2, \lambda_3]$);
- monostabilność związaną z punktem stabilnym ($\lambda > \lambda_3$).

Prowadzi nas to do wniosku, że w układzie występują trzy różne bifurkacje.

2) Zbiór wartości przyjmowanych zarówno przez punkt stacjonarny, jak i cykl stabilny dla różnych wartości λ , udało się uzyskać poprzez sprytne zastosowanie numerycznych symulacji układu. Mianowicie uzmienniony został parametr bifurkacyjny. Taki zabieg sprawił, iż trajektoria, której wartości początkowe pokrywały się z którymś z atraktorów, w miarę powolnej zmiany parametru bifurkacyjnego, w trakcie symulacji pozostawała na atraktorze. Przeprowadzenie takich symulacji pozwoliło odtworzyć amplitudę oscylacji cyklu stabilnego, oraz położenie punktu stacjonarnego w zależności od wartości parametru bifurkacyjnego λ . Co ciekawe, udało się również tym sposobem odtworzyć położenie niestabilnego punktu stacjonarnego.

3) W wyniku tych symulacji udało się ustalić, iż występujący w układzie cykl stabilny rodzi się w punkcie λ_3 (por. rysunek 3.2) ze stabilnego punktu stacjonarnego z zerową amplitudą. Taka sytuacja jednoznacznie wskazuje, że punkt λ_3 jest punktem bifurkacji nadkrytycznej Hopfa.

4) By ustalić, w wyniku jakiej bifurkacji pojawił się z niezerową amplitudą cykl stabilny w punkcie λ_1 został zmierzony okres oscylacji w pobliżu punktu narodzin cyklu. Wyniki tego pomiaru przedstawia rysunek 3.3. Skończony okres w punkcie bifurkacyjnym wyklucza bifurkację siodło węzeł na cyklu niezmienniczym oraz bifurkację homokliniczną. Pozostaje tylko bifurkacja siodło-węzeł dla orbity okresowej.



Rysunek 3.2: Portrety bifurkacyjne dla wybranych zmiennych modelu: (a) $I\kappa B\alpha_{cyt}$, (b) $NF_{-\kappa}B_{nuc}$, (c) A20, (d) $TNF\alpha_{int}$. Oznaczenia: ciągła linia - stacjonarny punkt stabilny, przerywana linia - stacjonarny punkt niestabilny, pełne koło - amplituda cyklu stabilnego, puste koło - amplituda cyklu niestabilnego. Występujące w układzie bifurkacje: λ_1 - bifurkacja siodło węzeł dla orbity okresowej; λ_2 - bifurkacja podkrytyczna Hopfa; λ_3 - bifurkacja nadkrytyczna Hopfa.



Rysunek 3.3: Okres oscylacji stabilnego cyklu granicznego.

5) Do rozpoznania pozostała już tylko bifurkacja w punkcie λ_2 . Wiemy, że wiąże się ona z nabyciem stabilności przez niestabilny punkt stacjonarny oraz że w jej wyniku nie powstaje żaden dodatkowy atraktor. Wskazuje to bezpośrednio na bifurkacje podkrytyczną Hopfa. Jak wiemy wiąże się ona również z narodzinami niestabilnego cyklu granicznego. Te jednak zazwyczaj przy pomocy numerycznych symulacji trudno jest zidentyfikować. W naszym modelu trajektorie znajdujące się w pobliżu niestabilnego cyklu, zanim zostały pochłonięte przez atraktor, w którego basenie przyciąganie akurat się znajdowały, spędzały w otoczeniu niestabilnego cyklu znaczącą ilość czasu. Przykłady takiej trajektorii przedstawione zostały na rysunku 3.4. Rysunek 3.4a przedstawia trajektorie, która po spędzeniu w pobliżu niestabilnej orbity około 120 godzin życia komórki spadła na stabilny punkt, natomiast rysunek 3.4b przedstawia trajektorie, która dopiero po niemal 200 godzinach, z otoczenia niestabilnego cyklu przeskoczyła na orbitę stabilną. Takie zachowanie tłumaczone jest w [12] jako quasistabilność orbity niestabilnej. A dla nas dodatkowo potwierdziło wynik przeprowadzonego wyżej rozumowania oraz umożliwiło dokładne określenie położenia orbity niestabilnej.



Rysunek 3.4: Trajektoria oscyluje w otoczeniu niestabilnego cyklu granicznego, a następnie przeskakuje (a) do punktu stabilnego lub (c) do cyklu stabilnego.

Model stochastyczny

W przyrodzie żadna komórka nie jest identyczna. Nawet gdy ograniczymy sie do jednego typu komórek raka mózgu, to wciąż nie ma reguły, która by mówiła jakie stężenie konkretnego białka powinna każda komórka w danym momencie swojego życia zawierać. Co więcej reakcja takich komórek na dokładnie taki sam zewnętrzny bodziec również nie musi być identyczna - może nią być proliferacja jak i apoptoza. Dlatego też modelowanie cyklu komórki jako procesu czysto deterministycznego, a zatem poprzez układ równań różniczkowych zwyczajnych, nie jest w stanie w pełni oddać różnorodności jej zachowań. Aby móc uwzględnić losowość zachodzących w komórce reakcji oraz uniezależnić trajektorie modelu od zadanych warunków początkowych, należy odwołać się do teorii procesów stochastycznych Markowa. Treścią niniejszego rozdziału jest krótkie wprowadzenie do tej teorii (w oparciu o [2]) wraz z jej zastosowaniem do modelu ścieżki regulatorowej NF- κB .

4.1. Proces Markowa

Definicje i oznaczenia

Niech $(\Omega, \mathcal{F}, \mathbb{P})$ będzie przestrzenią probabilistyczną, (S, \mathcal{E}) przestrzenią mierzalną, a T dowolnym zbiorem. Wówczas:

Definicja 4.1.1 Procesem stochastycznym o wartościach w S, określonym na zbiorze T nazywamy rodzinę zmiennych losowych $(X_t)_{t \in T}$ przyjmujących wartości w zbiorze S.

W interesującym nas przypadku parametr t traktujemy jako ciągłą zmienną czasową i wtedy T jest podzbiorem zbioru nieujemnych liczb rzeczywistych $\mathbb{R}_{\geq 0}$. Przestrzeń (S, \mathcal{E}) natomiast nazywamy przestrzenią stanów.

Definicja 4.1.2 Proces $(X_t)_{t\geq 0}$ jest **Markowa** (ma własność Markowa) jeśli dla $E \subset S$, $\xi \in S$ oraz $t, \tau \in T$ takich, że $t > \tau$ zachodzi

$$\mathbb{P}(X_t \in E | X_\tau = \xi) = \mathbb{P}(X_t \in E | X_\eta, 0 < \eta \leqslant \tau)$$
(4.1)

Wówczas dobrze zdefiniowana jest funkcja prawdopodobieństwa:

$$\mathbb{P}(X_t \in E) := \int_S \mathbb{P}(X_t \in E | X_\tau = \omega) d_\Omega \mathbb{P}(\Omega, \tau)$$
(4.2)

Z której dzieląc przedział $[\tau, t]$ punktem $s \in [\tau, t]$ dostajemy równość

$$\mathbb{P}(X_t \in E | X_\tau = \xi) = \int_S \mathbb{P}(X_t \in E | X_s = \omega) d_\Omega \mathbb{P}(X_s \in \Omega, | X_\tau = \xi)$$
(4.3)

zwaną równaniem Chapmana - Kołmogorowa.

Rozpatrzmy teraz zmiany wartości procesu X, w małym przedziale czasowym. Załóżmy, że prawdopodobieństwo nastąpienia więcej niż jednej zmiany wartości procesu jest wielkością zmierzającą do zera szybciej niż Δt . Wówczas wprowadzając funkcję intensywności zmian wartości procesu $q(X_t = \xi)$ możemy zapisać $q(X_t = \xi)\Delta t + o(\Delta t)$ - prawdopodobieństwo, że proces X zmieni swoją wartość w przedziale czasowym $(t, \Delta t)$ pod warunkiem, że w chwili t przyjął wartość ξ . Ponadto, niech $Q(E|X_t = \xi)$ oznacza prawdopodobieństwo, ze jeśli w chwili t proces X przyjął wartość ξ oraz w przedziale czasowym $(t, \Delta t)$ zmienił swoją wartość, to $X_{t+\Delta t} \in E$. Tak przyjęte oznaczenia pozwalają nam zapisać równanie:

$$\mathbb{P}(X_{t+\Delta t} \in E | X_t = \xi) = (1 - q(X_t = \xi)\Delta t)\chi_E(\xi) + Q(E|X_t = \xi)q(X_t = \xi)\Delta t + o(\Delta t),$$
(4.4)

gdzie $\chi_E(\xi)$ oznacza funkcje charakterystyczną zbioru E, tzn.

$$\chi_E(\xi) = \begin{cases} 1 , \, \text{dla} \ \xi \in E \\ 0 , \, \text{w.p.p.} \end{cases}$$

w literaturze równanie (4.4) znane jest jako równanie Master.

Proces Poissona

Proces Poissona jest najbardziej znanym przykładem procesu Markowa o co najwyżej przeliczalnej przestrzeni stanów. Można go uzyskać poprzez postawienie dodatkowego warunku o niezależności prawdopodobieństw przejść od aktualnego stanu układu oraz zdefiniowanie funkcji intensywności. Dla procesu Poissona:

$$q(X_t = \xi) = \lambda \qquad (\lambda = const > 0). \tag{4.5}$$

Wówczas przyjmując tradycyjne oznaczenie $P_n(t)$ prawdopodobieństwa, że proces w chwili t jest w stanie $n \in \mathbb{N}$, równanie Master dla $n \ge 1$ ma następującą postać:

$$P_n(t + \Delta t) = (1 - \lambda \Delta t)P_n(t) + \lambda P_{n-1}(t)\Delta t + o(\Delta t).$$
(4.6)

Zaś dla n = 0 (gdy przejście do stanu n-1 jest nie możliwe), dostajemy

$$P_0(t + \Delta t) = (1 - \lambda \Delta t)P_0(t) + o(\Delta t).$$

$$(4.7)$$

Równania te po odpowiednim uporządkowaniu i przejściu
z Δt do granicy w zerze sprowadza się do postaci

$$\frac{d}{dt}P_n(t) = -\lambda P_n(t) + \lambda P_{n-1}(t)$$
(4.8)

oraz

$$\frac{d}{dt}P_0(t) = -\lambda P_0(t), \qquad (4.9)$$

dla $n \ge 1$ i n = 0 odpowiednio. Rozwiązaniem tego nieskończonego układu równań, gdy za warunek początkowy weźmiemy $P_0(0) = 1$, jest rozkład Poissona

$$P_n(t) = \frac{(\lambda t)^n}{n!} e^{-\lambda t}.$$
(4.10)

Proces Poissona jest tzw. procesem zliczającym. Pozwala on modelować reakcje trwające nieskończenie krótko i zachodzące w losowym czasie. Interesuje nas jednak tylko ich łączna liczba i zakładamy, że są tego samego rodzaju.

Proces urodzin

Pierwszym krokiem uogólniającym założenia procesu Poissona jest dozwolenie aby funkcja intensywności zmian procesu q, mogła zależeć również od stanu w jakim w danej chwili się układ znajduje. Wówczas można interpretować $P_n(t)$ jako prawdopodobieństwo, że w chwili t populacja danego gatunku składa się z dokładnie n osobników, zaś $q\Delta t$ jest prawdopodobieństwem narodzin nowego osobnika. Takie podejście prowadzi jednak do rozpatrywania nieskończenie dużych populacji, dlatego zajmiemy się przypadkiem bardziej realistycznym, który uwzględnia również możliwość śmierci osobnika, a zarazem daje możliwość modelowania reakcji biochemicznych.

Proces urodzin i śmierci

Niech funkcja intensywności przejść będzie następującej postaci:

$$q(X_{t+\Delta t} = j | X_t = i) = \begin{cases} \lambda_i & \text{dla } j = i+1\\ \mu_i & \text{dla } j = i-1\\ 0 & \text{w.p.p.} \end{cases}$$

Wówczas prawdopodobieństwo urodzin w przedziale $(t, t + \Delta t)$, czyli przejścia ze stanu n do stanu n + 1 wynosi $\lambda_n \Delta t + o(\Delta t)$, natomiast prawdopodobieństwo śmierci, czyli przejścia ze stanu n do stanu n - 1 jest równe $\mu_n \Delta t + o(\Delta t)$.

Aby obliczyć $P_n(t + \Delta t)$ należy zauważyć, że układ może znajdować się w stanie n wtedy i tylko wtedy, gdy zaszło któreś z poniższych zdarzeń:

- w chwili t układ był w stanie n i żadna zmiana w przedziale czasowym $(t,t+\Delta t)$ nie zaszła;
- w chwili t układ był w stanie n-1 i przeszedł do stanu n (urodziny)
- w chwili t układ był w stanie n+1 i przeszedł do stanu n (śmierć)
- w czasie $(t, t + \Delta t)$ zaszła więcej niż jedna zmiana, ale w ich efekcie układ znalazł się w stanie n.

Z uwagi na to, że pierwsze trzy możliwości są zdarzeniami rozłącznymi, natomiast prawdopodobieństwo ostatniego dąży do zera szybciej niż Δt , możemy wypisać równanie M dla procesu urodzin i śmierci:

$$P_n(t + \Delta t) = P_n(t)(1 - \lambda_n \Delta t - \mu_n \Delta t) + \lambda_{n-1} \Delta t P_{n-1}(t) + \mu_{n+1} \Delta t P_{n+1}(t) + o(t).$$
(4.11)

Po odpowiednim uporządkowaniu i przejściu granicznym z Δt to zera, dostajemy równanie różniczkowe

$$\frac{d}{dt}P_n(t) = -(\lambda_n + \mu_n)P_n(t) + \lambda_{n-1}P_{n-1}(t) + \mu_{n+1}P_{n+1}(t)$$
(4.12)

dla $n \ge 1$, zaś dla n = 0:

$$\frac{d}{dt}P_0(t) = -\lambda_0 P_0(t) + \mu_1 P_1(t).$$
(4.13)

4.2. Stochastyczny model ekspresji genu

Rozpatrując komórkę jako złożony reaktor biochemiczny można oddziaływania pomiędzy znajdującymi się w jej wnętrzu białkami rozpatrywać jako oddzielne reakcje. Mówienie o stężeniu białka, gdy jego cząsteczek jest w komórce kilkadziesiąt tysięcy jest uzasadnione i w takich przypadkach deterministyczne modelowanie uwzględniających je reakcji daje zadowalające rezultaty. Jednak w przypadku gdy cząsteczek biorących udział w rozpatrywanych reakcjach jest mniej, lub gdy rozpatrujemy proces aktywacji genu, o którym zakładamy, że może przyjąć tylko jeden z dwóch stanów: aktywny bądź nieaktywny, modelowanie w sposób ciągły jest całkowicie nieuzasadnione. By przejść do opisu zachowania pojedynczych molekuł w układzie należy przejść do stochastycznego opisu zachodzących reakcji, opartego na teorii procesów Markowa z dyskretną przestrzenią stanów.

Na podstawie klasycznego modelu reakcji związanych z aktywacją genu [6], będących głównym źródłem stochastyczności w komórce, przedstawię w tym paragrafie zasady na jakich opiera się budowa całego stochastycznego modelu sieci regulatorowej $NF-\kappa B$.

Proces aktywacji genu

Kontrola aktywności genu w komórce odbywa się poprzez przyłączanie lub dysocjację czynnika transkrypcyjnego. Analogicznie do procesu urodzin i śmierci rozpatrujemy procesy aktywacji i dezaktywacji genu, transkrypcji i degradacji mRNA oraz translacji i degradacji białka. W tym modelu współczynniki aktywacji i dezaktywacji uzależniamy od liczby cząsteczek syntetyzowanego białka (uwzględniamy autoregulacje). Model opisywany jest przez trzy zmienne:

- $m(t) \in \mathbb{N}$ liczba cząsteczek mRNA rozpatrywanego białka;
- $p(t) \in \mathbb{N}$ liczba cząsteczek białka;
- $G(t) \in \{0,1\}$ binarna zmienna losowa opisująca stan genu.

Między którymi zachodzą reakcje przedstawione na rysunku 4.1 o następujących współczynnikach:

- a(p) współczynnik aktywacji genu zależny od ilości białka;
- b(p) współczynnik dezaktywacji genu zależny od ilości białka;
- t_1 tempo transkrypcji mRNA;
- t₂ tempo translacji białka;
- r_1 tempo degradacji mRNA;
- r₂ tempo degradacji białka.

Celem jest wypisanie równań Master opisujących ewolucje w czasie prawdopodobieństwa, że nasz układ znajdzie się stanie zadanym przez zmienne (m, p, G). Oznaczmy przez $x_{mp}(t)$ łączne prawdopodobieństwo, że w układzie w chwili t znajduje się m cząsteczek mRNA, p cząsteczek białka, a gen jest aktywny (układ jest w stanie (m, p, 1)), zaś przez $y_{mp}(t)$



Rysunek 4.1: Schemat modelu aktywacji genu z autoregulacją.

prawdopodobieństwo, że układ jest w stanie (m, p, 0). Równanie M:

$$\frac{d}{dt}x_{mp}(t) = ay_{mp} - bx_{mp} + t_1x_{(m-1)p} - t_1x_{mp} + r_1(m+1)x_{(m+1)p} - r_1mx_{mp} \quad (4.14)$$

$$+ r_2(p+1)x_{m(p+1)} - r_2px_{mp} + t_2mx_{m(p-1)} - t_2mx_{mp}$$

$$\frac{d}{dt}y_{mp}(t) = -ay_{mp} + bx_{mp} + r_1(m+1)y_{(m+1)p} - r_1my_{mp} \quad (4.15)$$

$$+ r_2(p+1)y_{m(p+1)} - r_2py_{mp} + t_2my_{m(p-1)} - t_2my_{mp}$$

Proces aktywacji genu diploidalnego

W modelu ścieżki regulatorowej $NF-\kappa B$ założyliśmy, że w jądrze komórkowym znajdują się po dwie kopie genów A20, $I\kappa B\alpha$ oraz $TNF\alpha$. Oznacza to, że zmienna G opisująca stan danego genu, może przyjmować wartości ze zbioru 0, 1, 2. Wartość 0 jest przyjmowana, gdy obie kopie genu są nie aktywne, 1 gdy jedna z nich jest aktywna, natomiast 2 gdy obie kopie są włączone. Reakcje zachodzące w tym modelu przedstawia schemat na rysunku 4.2. Pełen opis tego przypadku, jak również jego uogólnienie na N kopii genu, można znaleźć w [6].



Rysunek 4.2: Schemat modelu aktywacji diploidalnego genu z autoregulacją.

Symulacje numeryczne

Rozpatrywanie prawdopodobieństw, że układ w danej chwili czasowej znajduje się w określonym stanie, prowadzi do stworzenia nieskończonego układu równań M. Rozwiązanie analityczne takiego układu ze względu na jego niedomknięcie lub zbyt duża złożoność jest najczęściej niemożliwe. W takich przypadkach z pomocą przychodzą algorytmy numeryczne. Powszechnie stosowaną metodą symulacji stochastycznych reakcji zachodzących w komórkach jest algorytm Gillespiego [5]. W poniższym rozdziale przedstawię założenia oraz kolejne kroki tego algorytmu, jak również wyniki opartych na nim symulacji numerycznych.

5.1. Algorytm Gillespiego

Pierwotnie Dan Gillespie opublikował swój algorytm w 1977 roku [5] jako sposób na modelowanie reakcji chemicznych. Jego pomysł polegał na tym, by nie analizować prawdopodobieństw przyjęcia danego stanu przez wszystkie zmienne osobno, lecz rozpatrywać jednie jedną trajektorie układu, zaś koncentracje cząsteczek biorących udział w reakcjach estymować.

Niech więc S(t) będzie wektorem stanu, a S(0) stanem początkowym układu. Wówczas w danej chwili t, a więc każdym kroku symulacji, układ znajduje się w dokładnie jednym określonym stanie. Zanim w wyniku zajścia jednej z reakcji nastąpi zmiana tego stanu, muszą zostać podjęte dwie decyzje:

1) po jakim czasie ma zajść następna reakcja,

2) która z reakcji ma zajść.

By móc to zrobić oznaczmy przez $q(i, \tau)d\tau$ prawdopodobieństwo, że *i*-ta reakcja zaszła w infinitezymalnym przedziale czasowym $d\tau$ po czasie τ , tzn. w chwili $T \in (t + \tau, t + \tau + d\tau)$. Możemy wówczas $q(i, \tau)d\tau$ zapisać jako iloczyn prawdopodobieństw $P_0(\tau)$ - że w czasie τ żadna reakcja nie zaszła oraz $P_i(d\tau)$ - że *i*-ta reakcja zaszła w przedziale $d\tau$:

$$q(i,\tau)d\tau = P_0(\tau)P_i(d\tau).$$
(5.1)

Prawdopodobieństwo zajścia reakcji w przedziale czasowym $d\tau$ wygodnie jest zapisać za pomocą tzw. skłonności zajścia reakcji a_i , zdefiniowanej równaniem $P_i(d\tau) = a_i d\tau$. Wówczas prawdopodobieństwo $P(d\tau)$ zajścia, którejkolwiek z rozpatrywanych N reakcji w przedziale $d\tau$, zapisuje się jako sumę prawdopodobieństw

$$P(d\tau) = \sum_{i=1}^{N} P_i(d\tau) = \sum_{i=1}^{N} a_i d\tau \equiv a d\tau.$$
(5.2)

Można więc zapisać wyrażenie na prawdopodobieństwo, iż żadna reakcja nie zajdzie w przedziale $(t, t + \tau + d\tau)$ w następujący sposób

$$P_0(\tau + d\tau) = P_0(\tau)(1 - ad\tau).$$
(5.3)

Równanie to po uporządkowaniu i przejściu z $d\tau$ do granicy w zerze daje się zapisać jako następujące równanie różniczkowe:

$$\frac{d}{d\tau}P_0(\tau) = -aP_0(\tau),\tag{5.4}$$

którego rozwiązaniem, przy naturalnym warunku początkowym $P_0(0) = 1$, jest $P_0(\tau) = e^{-a\tau}$. Stąd, sumując równanie (5.1) po wszystkich reakcjach dostajemy

$$q(\tau)d\tau \equiv \sum_{i=1}^{M} q(i,\tau)d\tau = P_0(\tau) \sum_{i=1}^{M} P_i(d\tau) = e^{-a\tau} a d\tau,$$
(5.5)

czyli rozkład gęstości czasu oczekiwania na kolejne zajście kolejnych reakcji jest ekspotencjalny

$$q(\tau) = ae^{-a\tau}.\tag{5.6}$$

Rozkład reakcji dostajemy poprzez prawdopodobieństwo warunkowe zajści
ai-tej reakcji w chwili τ :

$$q(i|\tau)d\tau = \frac{q(i,\tau)d\tau}{q(\tau)d\tau} = \frac{a_i e^{-a\tau}}{a e^{-a\tau}} = \frac{a_i}{a}.$$
(5.7)

Mamy więc odpowiedzi na oba pytania w formie rozkładów. Na potrzeby algorytmu wyliczamy dla rozkładu czasów kwantyl rzędu r_1 :

$$t = \frac{1}{a} \ln\left(\frac{1}{1-r_1}\right),\tag{5.8}$$

gdzie r_1 pochodzi z rozkładu jednorodnego $\mathcal{U}[0,1]$, możemy więc równoważnie zapisać wyrażenie na czas τ następnej reakcji jako

$$\tau = -\frac{1}{a}\ln r_1. \tag{5.9}$$

Typ reakcji natomiast wyznaczamy losując liczbę r_2 z $\mathcal{U}[0,1]$ i znajdując taką reakcje i, że

$$\sum_{j=1}^{i-1} \frac{a_j}{a} \leqslant r_2 < \sum_{j=1}^{i} \frac{a_j}{a}.$$
(5.10)

Przyjmując przedstawione wyżej oznaczenia algorytm Gillespiego przebiega następująco:

- 1. Ustawiamy t = 0 i ustalamy S(0).
- 2. Dla ustalonego t oraz S(t) wylicz $a_i \quad \forall_{i \in 1,...,M}$ oraz a.
- 3. Losujemy $r_1, r_2 \ge \mathcal{U}[0, 1]$, wyliczamy $\tau \ge (5.9)$ oraz znajdujemy *i* zgodnie z (5.10)
- 4. Zmieniamy t na $t + \tau$ i zgodnie z *i*-tą reakcją wyliczamy $S(t + \tau)$.
- 5. Kończymy symulację jeśli wszystkie $a_i = 0$ lub czas symulacji dobiegł końca, w przeciwnym wypadku wracamy do punktu 2.

5.2. Stochastyczne efekty

Stosując opisany wcześniej algorytm stochastycznych symulacji Gillespiego przeprowadziłem szereg różnego rodzaju symulacji naszego modelu ścieżki sygnałowej $NF-\kappa B$. Zgodnie z przewidywaniami okazało się, że zachowanie modelu w przypadku symulacji stochastycznych znacząco różni się od analizowanego wcześniej przypadku modelu deterministycznego. Poniżej omówię napotkane różnice oraz ich konsekwencje przy ustalaniu parametrów modelu.

Skoki między atraktorami

Pierwszym spostrzeżeniem jakie należy poczynić porównując oba podejścia jest ogólne stwierdzenie iż w przypadku monostabilnych układów trajektoria deterministyczna jest dobrym przybliżeniem uśrednionych trajektorii stochastycznych. W naszym modelu efekt ten jest widoczny dla małych wartości parametru bifurkacyjnego λ i krótkich czasów symulacji - patrz Rysunek 5.1.



Rysunek 5.1: Porównanie deterministycznych (gruba czarna linia) i stochastycznych (cienkie kolorowe) trajektorii dla $\lambda=0.025$

Dla wartości parametru bifurkacyjnego λ , dla których układ deterministyczny jest bistabilny tzn. występują dwa atraktory, uśrednianie stochastycznych trajektorii traci sens. Powodem są występujące w układzie skoki trajektorii pomiędzy obszarami, które w modelu deterministycznym odpowiadały atraktorom. Takie zachowanie modelu jest już w przypadku występowania dwóch stabilnych punktów dobrze znane i opisane w szeregu publikacjach (m.in. Ge [4], Song [14]). W naszym modelu takimi atraktorami są punkt stabilny i stabilny cykl graniczny. Układy w których jednym z atraktorów jest stabilny cykl jest wciąż obiektem badań ([9], [7]). W mojej pracy przedstawię analizę zachowań modelu w takiej sytuacji opartą o numeryczne symulacje. Rysunki 5.2 i 5.3 przedstawiają przykładowe trajektorie dla parametru bifurkacyjnego $\lambda = 0.05$ tzn. takiego, w którym układ jest bistabilny. Na rysunku 5.2 pogrubioną czarną linią został przedstawiony stabilny cykl graniczny, zaś czarna kropka oznacza stabilny punkt stacjonarny układu deterministycznego. Warto zauważyć, że cienka czerwona linia przedstawiająca trajektorie stochastyczną znajduje się dokładnie w otoczeniu stabilnych atraktorów układu deterministycznego. Rysunek 5.3 pokazuje bardzo długą symulacje (3000 godzin) trajektorii NF- κB_{nuc} . Widać na nim wyraźnie, że po spędzeniu pewnego czasu w okolicach punktu stabilnego (małe wartości NF- κB_{nuc}) trajektoria przeskakuje do obszaru oscylacji (wyższe wartości NF- κB_{nuc}), a potem znów wraca w okolice punktu. W dalszej części pracy przedstawiona zostanie ilościowa analiza tego zachowania.



Rysunek 5.2: Porównanie deterministycznej (gruba czarna linia) i stochastycznej (cienka czerwona linia) trajektorii dla $\lambda = 0.05$ (bistabilność w modelu deterministycznym)

Rezonans stochastyczny

Skoki stochastycznych trajektorii pomiędzy obszarami odpowiadającymi deterministycznym atraktorom to zachowanie, którego się w naszym modelu spodziewaliśmy. Kolejnym, mniej spodziewanym, efektem stochastycznym, który został zaobserwowany jest rezonans stochastyczny [3]. Zjawisko to polega występowaniu oscylacji w modelu stochastycznym dla większego zakresu wartości parametru bifurkacyjnego niż w modelu deterministycznym. W takim przypadku mówi się o rozmyciu deterministycznych przewidywań modelu. Przykładowe porównanie trajektorii w przypadku gdy deterministyczny układ jest monostabilny ($\lambda = 0.025$) przedstawia rysunek 5.4. Widzimy, ze pogrubiona czarna linia po wykonaniu kilku gasnących oscylacji spada do punktu stabilnego, natomiast cienka czerwona trajektoria stochastyczna mimo to podlega oscylacjom. Na rysunku 5.5 widzimy analogicznie do rysunku 5.3, jak stochastyczna trajektoria $NF-\kappa B_{nuc}$ zachowuje się w czasie. Tym razem jednak, gdy



Rysunek 5.3: (a) Przeskakująca stochastyczna trajektoria $NF \kappa B_{nuc}$ pomiędzy obszarem oscylacji (wyższe wartości), a stanem stałym (niższe wartości) dla $\lambda = 0.05$; (b) Stochastyczna trajektoria $NF \kappa B_{nuc}$ w obszarze oscylacji; (c) Stochastyczna trajektoria $NF \kappa B_{nuc}$ w obszarze punktu stałego.

 $\lambda=0.025$ czas spędzony przez trajektorie w obszarze oscylacji jest znacząco mniejszy. Efekt ten został przeze mnie numerycznie zmierzony. Rysunek 5.6 przedstawia jak zmienia się średni czas spędzony w obszarze oscylacji w zależności od wartości parametru bifurkacyjnego λ . Warto zauważyć, że dla wartości λ , dla której pojawia się deterministyczny cykl graniczny stochastyczna trajektoria oscyluje tylko 35% czasu, natomiast 90% gdy punkt stacjonarny traci stabilność. Kolejną badaną przeze mnie własnością rezonansu stochastycznego w naszym modelu był okres oscylacji stochastycznych zarówno w obecności deterministycznego cyklu, jak i bez niego. Wyniki przedstawia rysunek 5.7. Widzimy, że okresy te są do siebie zbliżone, zaś po zniknięciu deterministycznego cyklu stochastyczne oscylacje utrzymują rosnący trend okresu.



Rysunek 5.4: Porównanie deterministycznej (gruba czarna linia) i stochastycznej (cienka czerwona linia) trajektorii dla $\lambda=0.025$ (monostabilny model deterministyczny)



Rysunek 5.5: Przeskakująca stochastyczna trajektoria $NF\kappa B_{nuc}$ pomiędzy obszarem oscylacji (wyższe wartości), a stanem stałym (niższe wartości) dla $\lambda = 0.025$



Rysunek 5.6: Średni czas oscylacji stochastycznej trajektorii w zależności od parametru bifurkacyjnego $\lambda.$



Rysunek 5.7: Zestawienie okresu oscylacji stochastycznych (czarna kropka) i deterministycznych (ciągła linia).

Weryfikacja modelu

Głównym celem dodania do istniejącego już modelu sprzężenia dodatniego była próba zrozumienia mechanizmu samoaktywacji komórek rakowych typu SK-N-AS. Opublikowane w 2010 roku rezultaty eksperymentów grupy M.R. White'a [16] wskazywały, że około 20% komórek tego typu podlega samoaktywacji, tzn. bez zewnętrznej stymulacji czynnik transkrypcyjny $NF\kappa B$ zaczyna przemieszczać się z jądra komórkowego do cytoplazmy i z powrotem z okresem około 100 minut. Zaobserwowano również iż prawdopodobieństwo aktywacji komórki przez zewnętrzny sygnał rosło wraz z dawką podawanego $TNF\alpha$, aż do wysycenia przy około 100 pg/ml dla stymulacji ciągłej oraz 10 ng/ml przy stymulacji pięciominutowym pulsem¹.

Rodzaje eksperymentów i charakter danych

Dane uzyskane podczas eksperymentów nie są danymi ilościowymi. Uzyskane rezultaty często przedstawiane są w postaci tzw. blotów², bądź też zdjęć uzyskanych po oznaczeniu konkretnych białek związkami fluorescencyjnymi. Oba te sposoby dostarczają jedynie jakościowych danych na temat odpowiedzi komórki na konkretną zewnętrzną stymulację. Dzięki takim eksperymentom dostajemy informacje m.in. na temat występujących w układzie oscylacji i ich okresu. Nie możemy natomiast dokładnie określić w czasie ani liczby molekuł występujących białek ani ich dokładnego stężenia.

Parametry modelu dopasowywałem do danych z obserwacji pojedynczych komórek, mówiących o 100 minutowym okresie oscylacji oraz do trzech eksperymentów populacyjnych.

- 1. Pomiar samoaktywacji komórek bez zewnętrznej stymulacji (por. dawka $TNF\alpha = 0$ na rysunkach 6.1 i 6.2);
- 2. Pomiar frakcji komórek odpowiadających na ciągłą zewnętrzną stymulację $TNF\alpha$ (por. rysunek 6.1);
- 3. Pomiar frakcji komórek odpowiadających na zewnętrzną pulsową stymulację $TNF\alpha$ (por. rysunek 6.2).

Wyniki symulacji populacyjnych przedstawiają rysunki 6.1 i 6.2. Pokazują one jaki procent symulowanej populacji komórek został wzbudzony do oscylacji pod wpływem różnych dawek $TNF\alpha$. Analogicznie do wyników eksperymentalnych z [16], na wykresach różnymi kolorami

¹Stymulacja pulsowa polega na usunięciu po danym czasie cytokin $TNF\alpha$ z otoczenia komórek rakowych. ²Metoda ta polega na oznaczeniu barwnikami białek rozdzielonych według mas i struktury.

zostały oznaczone komórki, które odpowiedziały na stymulację po 100, 200, 300, 400 i 500 minutach.

Przebieg symulacji

By zapewnić losowość warunków początkowych trajektorii poszczególnych komórek z populacji, wartości te dla każdej komórki osobno były losowane z symulacji 300 godzin życia komórki bez zewnętrznej stymulacji.

By uwzględnić różnorodność komórek w populacji, przed każdą symulacją pojedynczej komórki, parametr M odpowiadający za liczbę wszystkich receptorów na błonie komórkowej był losowany. Rozkład liczby receptorów tak jak w [15] pozostał log-normalny, zmieniły się natomiast jego parametry. Jak widać na rysunku 6.4 wartość parametru bifurkacyjnego przy którym pojawiają się deterministyczne oscylacje zależy od całkowitej liczby receptorów. Postać tej zależności jest wyznaczona przez nieliniową część równania (2.2) opisującego aktywację receptorów. Widzimy więc, że przy ustalonej wartości parametru bifurkacyjnego prawdopodobieństwo aktywacji komórki jest tym większe im większa jest liczba receptorów.

Omówienie wyników

Możliwość zmiany parametrów rozkładu receptorów oraz parametru bifurkacyjnego pozwoliła w zadowalający sposób dopasować wyniki symulacji do danych eksperymentalnych grupy M.R. White'a. Ze względu na duży błąd pomiaru wyników eksperymentalnych (np. +/- 17.1% dla dawki $TNF\alpha = 0pg/ml$) naszym celem nie było dokładne ilościowe odwzorowanie tych wyników, a jedynie pokazanie możliwości modelu do symulowania odpowiedzi komórki na różne dawki $TNF\alpha$ oraz jej samoaktywacji. Uzyskane przez nas wyniki symulacji teoretycznie potwierdzają eksperymentalną hipotezę [8] o istnieniu i roli dodatniego sprzężenia zwrotnego w sieci regulatorowej NF- κB związanego z wewnętrzną produkcją $TNF\alpha$. Prowadzą nas one również do postawienia nowej hipotezy, iż również inne komórki (np. związane z obroną immunologiczną monocyty i makrofagi) o równie dużej lub większej wewnętrznej produkcji $TNF\alpha$, mogą doznawać autoaktywacji.



Rysunek 6.1: Wyniki symulacji populacyjnej dla ciągłej zewnętrznej stymulacji $TNF\alpha$



Rysunek 6.2: Wyniki symulacji populacyjnej dla 5 minutowego pulsu zewnętrznej stymulacji $TNF\alpha$



Rysunek 6.3: Rozkład gęstości receptorów użyty to symulacji populacyjnych.



Rysunek 6.4: Wartość parametru bifurkacyjnego dla bifurkacji siodło-węzeł na orbicie periodycznej (CF) w zależności od liczby receptorów.

Podsumowanie

 $NF\kappa B$ jest najważniejszym czynnikiem transkrypcyjnym związanym z wczesną obroną immunologiczną. W komórkach nowotworowych zablokowanie jego aktywności może doprowadzić do wprowadzenia komórki na szlak apoptozy. Jednym z zewnętrznych sygnałów, które mogą doprowadzić do takiej reakcji komórki jest tzw. czynnik martwicy nowotworu - $TNF\alpha$. Ze względu na jedno z jego źródeł jakim są znajdujące się w bliskiej odległości komórki, ważne jest dokładne poznanie mechanizmu jego aktywacji pod wpływem małych, fizjologicznych dawek. Ostatnie publikacje wyników eksperymentalnych [16] dodatkowo wskazują na możliwość aktywacji komórek bez zewnętrznej stymulacji. W pracy omówiłem modyfikacje modelu sieci regulatorowej $NF\kappa B$ przedstawionego w [15], która umożliwia symulację takiego zachowania komórki, jak również prawidłowo odwzorowuje jej odpowiedź na fizjologiczne dawki $TNF\alpha$. Wyniki te teoretycznie potwierdzają wcześniejsze eksperymentalne doniesienia [8] o możliwym dodatnim sprzężeniu zwrotnym w sieci regulatorowej $NF \kappa B$ związanym z wewnętrzną produkcją $TNF\alpha$ i jego roli w autoaktywacji komórki [16]. Na podstawie uzyskanych wyników weryfikacji modelu z eksperymentem można wysunąć hipotezę, iż autoaktywacja może występować również w innych komórkach o wysokim poziomie wewnętrznej produkcji $TNF\alpha$, np. związanych z obroną immunologiczną monocytach lub makrofagach. Spodziewamy się iż w takich komórkach może dochodzić do długotrwałej aktywacji NF- κB zarówno spontanicznej jak i na skutek zewnetrznego sygnału.

Przeprowadzone w trakcie budowy i analizy modelu symulacje numeryczne doprowadziły do badania ciekawych efektów stochastycznych związanych z występującą w układzie bistabilnością. Okazało się iż przewidywany przez deterministyczny układ zakres parametru bifurkacyjnego, w którym model jest bistabilny został rozmyty. Wskazujące na bistabilność skoki stochastycznych trajektorii pomiędzy obszarami, w których w modelu deterministycznym znajdowały się atraktory, występowały dla dużo szerszego zakresu parametrów niż wynikałoby to z modelu deterministycznego. Z jednej strony, w pobliżu bifurkacji siodło węzeł dla orbity okresowej zwiększył się zakres parametru bifurkacyjnego, w którym trajektorie oscylowały - miał miejsce tzw. stochastyczny rezonans. Z drugiej strony, dla wartości parametru λ w pobliżu bifurkacji podkrytycznej Hopfa zwiększył się zakres stabilności punktu stacjonarnego. Efekty te choć powszechnie znane ([9], [7]) nie zostały jeszcze opisane ścisłą teorią matematyczną, natomiast jak się okazało już są skutecznie wykorzystywane w modelowaniu układów biochemicznych.

Bibliografia

- M. Delhase, M. Hayakawa, Y. Chen, M. Karin. Positive and negative regulation of IkBa kinase activity through IKK. Science 284:309-313 (1999)
- [2] W. Feller. Wstęp do rachunku prawdopodobieństwa i jego zastosowania PWN Warszawa (1960)
- [3] L. Gammaitoni, P. Hänggi, P. Jung, F. Marchesoni. Stochastic Resonance Rev. Mod. Phys. 70:1 (1998)
- [4] H. Ge, H. Qian. Thermodynamic limit of a nonequilibrium steady state: Maxwell-type construction for a bistable biochemical system. Phys. Rev. Lett. 103:148103 (2009)
- [5] D.T. Gillespie. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. J. Phys. Chem. 81:2340-2361 (1977)
- [6] B. Hat-Plewińska. Wpływ ilości kopii genu na dynamikę sieci regulatorowych, rozprawa doktorska pod kierunkiem dr hab. Tomasza Lipniackiego, Warszawa (2009) oraz praca:
 B. Hat, P. Paszek, M. Kimmel, K. Piechor and T. Lipniacki. How the number of alleles influences gene autoregulation. J. Stat. Phys. 128:511-533 (2007)
- [7] A. Kolbus, A. Lemarchand, A.L. Kawczyński and B. Nowakowski. Coherence resonances in an excitable thermochemical system with multiple stationary states Phys. Chem. Chem. Phys. 12:13224-13231 (2010)
- [8] T.K. Lee, E.M. Denny, J.C. Sanghvi, J.E. Gaston, N.D Maynard, J.J. Hughey, M.W. Covert. A noisy paracrine signal determines the cellular NF-kappaB response to lipopolysaccharide Sci. Signal. 2:ra65 (2009)
- [9] A. Lemarchand, B. Nowakowski. Internal fluctuations in a thermochemical system: excitability, oscillations and coherence resonances J. Phys.: Condens. Matter 19:065130 (2007)
- [10] T. Lipniacki, K. Puszynski, P. Paszek, A.R. Brasier, M. Kimmel. Single TNFα trimers mediating NF-κB activation: Stochastic robustness of NF-κB signaling. BMC Bioinformatics 8:736-756 (2007)
- [11] M.P. Pando, I.M Verma. Signal-dependent and -independent degradation of free and NFκB-bound IκBα. J. Biol. Chem. 275:21278-21286 (2000)
- [12] O. Purcell, N.J. Savery, C.S. Grierson, M. Bernardo. A comparative analysis of synthetic genetic oscillators. J. R. Soc. Interface 7:1503-1524 (2010)

- [13] K. Puszyński. Deterministyczne i stochastyczne modele ścieżek regulatorowych związanych z apoptozą, rozprawa doktorska pod kierunkiem dr hab. Tomasza Lipniackiego, Gliwice (2009) oraz praca: T. Lipniacki, K. Puszyński, P. Paszek, A.R. Brasier, M. Kimmel. TNFα trimers mediating NF-kappaB activation: Stochastic robustness of NF-κ B signaling BMC Bioinformatics 8:376 (2007)
- [14] C. Song, H. Phenix, V. Abedi, M. Scott, B.P. Ingalls, M. Kærn, T.J. Perkins. Estimating the Stochastic Bifurcation Structure of Cellular Networks. PLoS Comput. Biol. 6(3) e1000699 (2010)
- [15] S. Tay, J. Hughey, T. Lee, T. Lipniacki, M. Covert, S. Quake. Single-cell NF-κB dynamics reveal digital activation and analogue information processing. Nature 466:267-271 (2010)
- [16] D.A. Turner, P. Paszek, D.J. Woodcock, D.E. Nelson, C.A. Horton, Y Wang, Spiller D.G., D.A. Rand, M.R. White, and C.V. Harper. *Physiological levels of TNF stimulation induce* stochastic dynamics of NF-kB responses in single living cells. J. Cell. Sci. **123**:2834-43 (2010)
- [17] I.E. Wertz, K.M. O.Rourke, H. Zhou, M. Eby, L. Aravind, S. Seshagiri, P. Wu, C. Wiesmann, R. Baker, D.L. Boone, A. Ma, E.V. Koonin, V.M. Dixit. *De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-κB signaling*. Nature **430**:694-699 (2004)
- [18] S. Wiggins. Introduction to Applied Nonlinear Dynamical Systems and Chaos Springer-Verlag (1990).
- [19] H. Zołądek. Jakościowa Teoria Równań Różniczkowych Zwyczajnych, skrypt napisany dla Studiów Zamawianych - pilotaż finansowany w ramach programu europejskiego POKL. http://mst.mimuw.edu.pl/wyklady/rrj/wyklad.pdf