

Politechnika Śląska
Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki

Deterministyczne i stochastyczne modele ścieżek regulatorowych związanych z apoptozą

Krzysztof Puszyński

praca doktorska
wykonana pod kierunkiem
dr hab. Tomasza Lipniackiego

GLIWICE 2009

Główne rezultaty mojej rozprawy doktorskiej opublikowane zostały w pracach:

Krzysztof Puszyński, Beata Hat, and Tomasz Lipniacki, "Oscillations and bistability in the stochastic model of p53 regulation", *J Theor Biol*, 254(2):452–465, Sep 2008.

Krzysztof Puszyński, Roberto Bertolusso, Tomasz Lipniacki, "Crosstalk between p53 and NF- κ B systems: pro- and anti-apoptotic functions of NF- κ B", *IET Systems Biology* - w publikacji.

W rozprawie wykorzystano również następujące publikacje:

Tomasz Lipniacki, **Krzysztof Puszyński**, Pawel Paszek, Allan R. Brasier, and Marek Kimmel, "Single TNF α trimers mediating NF- κ B activation: stochastic robustness of NF- κ B signaling", *BMC Bioinformatics*, 8:376, 2007.

Beata Hat, **Krzysztof Puszyński**, Tomasz Lipniacki, "Exploring mechanisms of oscillations in p53 and NF- κ B systems", *IET Systems Biology* - w publikacji

Niniejsza Rozprawa Doktorska była finansowana w ramach grantu promotorskiego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N N519 319535

Spis treści

1	Wprowadzenie	5
1.1	Motywacja prowadzonych badań i przedmiot pracy	5
1.2	Cel i tezy pracy	6
1.3	Przewodnik po rozdziałach	6
2	Podłoże biologiczne	9
2.1	Streszczenie	9
2.2	Budowa i działanie komórki	9
2.3	Szlaki sygnałowe	10
2.4	Czynnik transkrypcyjny p53	11
2.5	Czynnik transkrypcyjny NF- κ B	12
2.6	Apoptoza	12
2.7	Dane eksperymentalne	13
3	Deterministyczne i stochastyczne modelowanie ścieżek regulatorowych	17
3.1	Streszczenie	17
3.2	Podstawowe zależności wykorzystywane w modelowaniu	17
3.3	Modelowanie stochastyczne czy deterministyczne ?	21
3.4	Algorytmy stochastyczne i przybliżenie deterministyczne	22
3.5	Procedura dopasowania modelu do danych	28
4	Istniejące modele ścieżki sygnałowej NF-κB	31
4.1	Streszczenie	31
4.2	Modele grupy Hoffmana	32
4.3	Modele Lipniackiego i współpracowników	34
4.4	Struktura modelu Lipniackiego i współpracowników z roku (2007)	36
4.5	Rezultaty modelu Lipniackiego i współpracowników	40
5	Istniejące modele modułu regulatorowego p53 Mdm2	47
5.1	Streszczenie	47
5.2	Model Wee i Aguda	48
5.3	Modele grupy Tysona	49
5.4	Model Ma i in. (2005)	52
5.5	Model Batchelora i in. (2008)	53

6	Model ścieżki sygnałowej p53 Mdm2	55
6.1	Streszczenie	55
6.2	Struktura modelu	56
6.3	Równania	61
6.4	Przybliżenie deterministyczne	66
6.5	Rezultaty	66
7	Model łączny systemów NF-κB i p53	75
7.1	Streszczenie	75
7.2	Znane połączenia ścieżek NF- κ B I κ B α i p53 Mdm2	76
7.3	Struktura modelu	78
7.4	Równania	83
7.5	Przybliżenie deterministyczne	92
7.6	Rezultaty	93
8	Podsumowanie	105
	Bibliografia	115

Rozdział 1

Wprowadzenie

1.1 Motywacja prowadzonych badań i przedmiot pracy

Gdy zdrowa komórka eukariotyczna starzeje się, staje się zbędna dla tkanki i organizmu bądź ulega infekcji otrzymuje sygnał do samouśmiercenia na drodze apoptozy. Decyzja o zaprogramowanej śmierci podjęta może zostać również przez samą komórkę w momencie wykrycia przez nią swego uszkodzenia, a w szczególności uszkodzenia materiału genetycznego. Komórki nowotworowe, posiadające zmutowane DNA i zagrażające tkance nie popełniają apoptozy. Stają się one unieśmiertelnione z powodu nieprawidłowości występujących bądź to w samej ścieżce apoptozy bądź w modułach regulatorowych odpowiedzialnych za przekazanie sygnału o konieczności samounicestwienia, w szczególności w module p53|Mdm2. Zrozumienie procesów i zmian zachodzących w czasie nowotworzenia oraz ich identyfikacja prowadzić mogą do lepszego poznania schorzenia, a w przyszłości do opracowania skutecznej metody jego zwalczania. Eksperymenty biologiczne pozwalają na poznanie sieci połączeń pomiędzy poszczególnymi białkami oddziałującymi na siebie w komórce. Obecnie technika umożliwia obserwację zmian stężenia poszczególnych związków w pojedynczych komórkach czy nawet na obserwację pojedynczych cząsteczek we wnętrzu komórki, co daje możliwość zapoznania się z dynamiką procesów w niej zachodzących.

Symulacje komputerowe pozwalają na jeszcze lepsze poznanie i zrozumienie złożonych sieci powiązań wraz z dynamiką oddziaływań. Prawidłowo zbudowany model, nie tylko w sposób prawidłowy oddaje istniejącą wiedzę biologiczną, lecz może służyć do stawiania i wstępnej weryfikacji hipotez, których udowodnienie eksperymentalne jest dość kosztowne.

Motywacją badań zaprezentowanych w niniejszej rozprawie była chęć lepszego zrozumienia naturalnych mechanizmów regulatorowych związanych z odpornością immunologiczną, naprawą DNA i apoptozą; zapoznanie się z działaniem w przyrodzie elementów takich jak pętle sprzężenia zwrotnego czy układy wzmacniające oraz zaznajomienie się z procesami prowadzącymi do apoptozy. Motywacją badań była również chęć stworzenia modeli matematycznych pozwalających na oddanie istniejących eksperymentów i przewidywanie zachowań układu przy różnych protokołach wymuszeń i warunkach działania jak na przykład wyciszenie niektórych białek; modeli, które umożliwią weryfikacje hipotez jak i ich stawianie, co pozwoli na lepsze planowanie bądź uniknięcie niepotrzebnych i kosztownych eksperymentów biologicznych.

Przedmiotem badań są modele stochastyczne szlaku sygnałowego p53 oraz jego połączeń ze ścieżką NF- κ B i ich przybliżenia deterministyczne. Modele stochastyczne zbudowane zostały w oparciu o postulat Haseltine'a i Rawlingsa [30] przyspieszający algorytm

Gillespiego [25]. Przybliżenia deterministyczne modeli stochastycznych zbudowane zostały w oparciu o równania różniczkowe zwyczajne (ODE).

1.2 Cel i tezy pracy

Celem pracy było odtworzenie w formie modelu matematycznego struktury ścieżek sygnałowych p53 i NF- κ B na podstawie istniejącej wiedzy biologicznej, przyjętych założeń i uproszczeń oraz rozważań teoretycznych. Następnie takie dobranie parametrów aby odtworzyć obserwowane w eksperymentach zachowanie badanych układów. Do celu pracy należy również analiza zbudowanych modeli i próba przewidzenia ich zachowania w przypadkach nie posiadających jeszcze weryfikacji eksperymentalnej.

Przeprowadzone badania symulacyjne pozwalają na postawienie następujących dwóch tez:

1. Zaprezentowany w rozprawie model ścieżki sygnałowej p53 zawiera dwie pętle sprzężenia zwrotnego. Pętla ujemnego sprzężenia wraz z występującym w niej opóźnieniem związanym z transkrypcją i translacją Mdm2 wprowadza do modelu cykl graniczny odpowiadający za obserwowane eksperymentalnie oscylacje poziomów p53 i Mdm2 występujące po uszkodzeniu DNA. Sprzężenie dodatnie, w którym w związku z obecnością białek pośrednich (PTEN, PIP3 i Akt) występuje znaczne opóźnienie, pełni rolę przełącznika wprowadzając do układu bistabilność. Jeżeli naprawa uszkodzonego DNA jest wydajna, komórka wraca z cyklu granicznego do pierwotnego stanu ustalonego kojarzonego z przeżyciem. Jeżeli naprawa jest nieskuteczna bądź zajmuje zbyt wiele czasu, działanie sprzężenia dodatniego powoduje ustalenie się wysokiego poziomu p53 w komórce przełączając ją z cyklu granicznego w drugi stan ustalony kojarzony z apoptozą. Stochastyczność procesu regulatorowego uwzględniona w modelu umożliwia separację populacji komórek poddanych naświetleniu na frakcję przeżywającą i apoptotyczną.

2. Zaproponowany model łączny systemów NF- κ B i p53, będący pierwszą próbą zamodelowania dynamiki interakcji obu czynników transkrypcyjnych, pozwala wyjaśnić obserwowane w eksperymentach anty- i pro-apoptotyczne zachowanie się NF- κ B, uzależniając je od protokołu podawania wymuszeń. Stochastyczność procesów molekularnych pozwala na separację populacji komórek na dwie frakcje: przeżywającą i podlegającą apoptozie. Wielkość frakcji apoptotycznej przy ustalonej wielkości wymuszeń IR i TNF α zależy od kolejności ich podawania. Podanie TNF α przed naświetleniem zwiększa szansę komórek na przeżycie, podczas gdy podanie go po naświetleniu zwiększa ich śmiertelność.

1.3 Przewodnik po rozdziałach

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z ośmiu rozdziałów i bibliografii. Każdy z rozdziałów rozpoczyna się krótkim streszczeniem oraz omówieniem jego układu po którym następuje właściwa część.

Rozdział pierwszy stanowi wstęp, w którym przedstawiłem motywację prowadzonych badań, przedmiot pracy, cel oraz jej tezy.

W rozdziale drugim omówiłem podstawowe elementy wiedzy biologicznej wykorzystane w modelowaniu. Przedstawiłem budowę komórki pod kątem elementów występujących

w modelach takich jak receptory, cytoplazma z rybosomami, jądro komórkowe z zawartym w nim materiałem genetycznym. Wyjaśniłem pojęcie szlaku sygnałowego jak i istotę przesyłanego sygnału. W dalszej części rozdziału drugiego omówiłem obydwie czynniki transkrypcyjne występujące w rozprawie, to jest NF- κ B oraz p53 zwracając uwagę na pełnione przez nie w komórce funkcje jak i konsekwencje wynikające z powstania zaburzeń w ich regulacji. Przedstawiłem pojęcie apoptozy wyjaśniając jej mechanizm i funkcje w organizmie. Na końcu rozdziału zaprezentowałem przykładowe dane biologiczne na podstawie których opracowywana jest dynamika modeli.

Rozdział trzeci prezentuje prawa i zależności jakimi posłużyliśmy się przy budowie modeli takie jak prawo działania mas, kinetykę Michaelisa-Menten czy współczynnik Hilla. W części tej postarałem się również odpowiedzieć na pytanie o zasadność modelowania stochastycznego jak i deterministycznego szlaków sygnałowych. Przedstawiłem algorytm Gillespiego będący wzorcem modelowania stochastycznego oraz jego modyfikację τ -leap i postulat Haseltine'a Rawlingsa, o który oparliśmy implementację numeryczną modeli stworzonych w ramach rozprawy. Wyjaśniłem sposób uzyskiwania przybliżenia deterministycznego jak i procedurę dopasowywania modelu do danych eksperymentalnych.

Rozdziały czwarty i piąty opisują istniejące w literaturze modele szlaków sygnałowych odpowiednio NF- κ B oraz p53. Przetawiałem w nich budowę i dynamikę istniejących rozwiązań. W sposób rozszerzony opisałem nasz model ścieżki sygnałowej NF- κ B stworzony w 2007 roku (Lipniacki i in. [56]), który stał się podstawą do budowy modelu łącznego, przedstawionego w rozdziale siódmym.

Rozdziały szósty i siódmy stanowią główną część pracy doktorskiej prezentując zbudowane w jej ramach modele ścieżki sygnałowej p53 i łączny systemów NF- κ B i p53. Rozdział szósty zawiera dokładny opis struktury stworzonego modelu p53 z uwzględnieniem wiedzy biologicznej na której oparliśmy poszczególne jego elementy, założeń i uproszczeń jakimi się posłużyliśmy. W dalszej części rozdziału szóstego zaprezentowałem parametry jak i równania modelu i jego przybliżenia deterministycznego. Ostatnią część rozdziału szóstego stanowi przedstawienie wyników symulacji uzyskanych przy różnych protokołach wymuszenia oraz różnych warunkach działania modelu (wyłączenie i załączenie procesów naprawczych DNA oraz produkcji białka PTEN).

Rozdział siódmy rozpoczyna się od przedstawienia znanych z literatury połączeń pomiędzy ścieżkami NF- κ B i p53. Następnie opisana jest wiedza biologiczna, założenia i uproszczenia wykorzystane w budowie modelu łącznego. Kolejna część rozdziału siódmego prezentuje parametry oraz równania modelu stochastycznego i jego przybliżenia deterministycznego. Po niej następuje omówienie wyników symulacji modelu z uwzględnieniem jego zdolności do odtwarzania wyników uzyskanych przez modele bazowe (NF- κ B i p53). Zaprezentowane też zostają wyniki symulacji modelu przy użyciu różnych protokołów zakładających pobudzenie przez obydwie sygnały wejściowe: TNF α i IR.

Ósmy, ostatni rozdział stanowi podsumowanie rozprawy.

Rozdział 2

Podłoże biologiczne

2.1 Streszczenie

Rozdział drugi zawiera krótki opis podstawowych pojęć i wiedzy biologicznej wykorzystanych podczas opracowywania modeli. Przedstawiłem w nim istotne z punktu modelowania elementy komórki takie jak błona komórkowa z receptorami, jądro komórkowe zawierające materiał genetyczny i cytoplazma z zawartymi w niej rybosomami. Wyjaśniłem pojęcie szlaku sygnałowego i omówiłem czynniki transkrypcyjne p53 oraz NF- κ B. Związane z tymi czynnikami układy regulatorowe są przedmiotem rozprawy. Omówiłem skrótowo proces apoptozy oraz zaprezentowałem przykładowe dane wykorzystywane przy dopasowywaniu modeli zwracając uwagę na problemy pojawiające się przy ich pozyskiwaniu z populacji bądź z eksperymentów transfekcyjnych na pojedynczych komórkach.

2.2 Budowa i działanie komórki

Opis wszystkich składników komórki i ich działania nie mieści się w ramach niniejszej rozprawy i może być znaleziony w większości podręczników biologii. Poniżej omówiłem elementy komórki, istotne w budowie prezentowanych modeli, pod kątem ich roli w przekazywaniu sygnału.

Błona komórkowa oddziela wnętrze komórki od środowiska zewnętrznego. Na jej powierzchni znajduje się wiele struktur służących na przykład identyfikacji komórki przez mechanizmy obronne organizmu czy wykrywaniu bodźców zewnętrznych działających w otoczeniu komórki. Struktury te nie pozostają w spoczynku, lecz ciągle przemieszczają się w sposób chaotyczny mający charakter ruchów Browna. Struktury białkowe wykrywające sygnał na zewnątrz komórki i w przypadku jego pojawienia się aktywujące białka sygnalizacyjne w cytoplazmie komórki zwane są receptorami. Na powierzchni komórki znajduje się wiele rodzajów receptorów, z których każdy reaguje zazwyczaj na jeden rodzaj pobudzenia. Działanie receptorów można przedstawić na przykładzie receptora TNFR1 wykorzystanego w rozprawie. Bodźcem na który TNFR1 reaguje jest pojawienie się w otoczeniu komórki ligandu TNF α (tumor necrosis factor alpha) występującego w postaci trymeru (trzech połączonych ze sobą cząsteczek). Przyłączenie się trymera TNF α do receptora powoduje jego trymeryzację, czyli przyłączenie się do tak powstałego kompleksu dwóch dodatkowych receptorów. Część wewnętrzna tak stworzonego trymeru receptorowego zyskuje zdolność przyłączania do siebie między innymi cząsteczek RIP i TRAF2, co

proceedzi do aktywacji całego kompleksu i uzyskania zdolności aktywacji kinazy IKKK, przekazującej impuls w głąb komórki, poprzez odpowiedni szlak sygnałowy. Samoistne bądź wymuszone odłączenie się ligandu bądź któregoś z białek od kompleksu receptora dezaktywuje go.

Cytoplazma jest układem koloidalnym białek zawieszonych w roztworze wodnym wypełniającym wnętrze komórki. W cytoplazmie znajdują się organelle takie jak mitochondria, jądro komórkowe czy interesujące z punktu widzenia modelowania szlaków sygnałowych rybosomy, w których zachodzi proces translacji mRNA do postaci gotowego białka. Głównym zadaniem części cytoplazmatycznej omawianych w ramach niniejszej rozprawy szlaków sygnałowych jest wzmocnienie odebranego przez komórkę sygnału i przekazanie go do jądra komórkowego.

Jądro komórkowe z perspektywy budowanych modeli jest miejscem w komórce, w którym przechowywany jest materiał genetyczny i w którym zachodzi proces transkrypcji. Możliwe jest w nim również przekazywanie sygnału podobnie jak w cytoplazmie. Produkcja mRNA w procesie transkrypcji zachodzi po uaktywnieniu genu poprzez odpowiednie białko zwane czynnikiem transkrypcyjnym. W uproszczeniu przyjmuje się, iż kompleksy transkrypcyjne gotowe są do produkcji mRNA i czekają jedynie na dołączenie się czynnika transkrypcyjnego do obszaru promotora. Po jego przyłączeniu proces transkrypcji przebiega z pełną możliwą szybkością do chwili samoistnego bądź wymuszonego odłączenia się czynnika transkrypcyjnego z wspomnianego obszaru. Normalna, niezmodyfikowana komórka posiada dwie kopie większości genów, z których każda może być aktywowana bądź dezaktywowana niezależnie.

2.3 Szlaki sygnałowe

Szlakiem sygnałowym (ścieżką sygnałową, modulem regulatorowym) nazywamy zbiór reagujących ze sobą substratów takich jak białka, transkrypty, geny bądź receptory, współpracujących przy kontroli jednej lub więcej funkcji komórki. Sekwencyjne aktywację i dezaktywację białek (w szczególności kinaz białkowych) służą przetwarzaniu informacji i wypracowaniu właściwej odpowiedzi na stymulację.

Składniki szlaku sygnałowego najczęściej tworzą strukturę łańcuchową ze sprzężeniami zwrotnymi. Proces przekazywania sygnału polega na fosforylacji, acetylacji bądź ubikwitynacji kolejnych typów białek jak na przykład (omówiona dalej) aktywacja kinazy IKK przez kinazę IKKK czy (również omówiona dalej) fosforylacja Akt przez PIP3. Szlak sygnałowy tworzą następujące moduły funkcyjne:

- Aktywacja i dezaktywacja receptorów - moduł służący wychwyceniu sygnału z otoczenia komórki i przekazaniu go w jej głąb. Wiele szlaków sygnałowych jak na przykład omówiony dalej NF- κ B rozpoczyna się od aktywacji receptorów. Prawdopodobieństwo aktywacji receptora jest proporcjonalne do koncentracji aktywującej cytokiny w otoczeniu komórki. Jego dezaktywacja może być samoistna (na skutek odłączenia aktywatora lub endocytozy - wciągnięcia receptora do wnętrza komórki) bądź zależna od sygnałów zewnętrznych.
- Aktywacja i dezaktywacja genów - aktywacja genów następuje poprzez przyłączenie się czynnika transkrypcyjnego do obszaru promotora, co pozwala na rozpoczęcie procesu transkrypcji. Dezaktywacja związana jest z samoistnym bądź wymuszonym

odczepieniem się cząsteczki czynnika transkrypcyjnego z tego obszaru lub przyczepieniem się represora.

- Transkrypcja i translacja - gen w stanie aktywnym produkuje mRNA białka które koduje. Produkcja ta jest ciągła i trwa do czasu dezaktywacji genu. W jej wyniku jedna kopia aktywnego genu może wyprodukować kilkadziesiąt - kilkaset kopii mRNA, które po przedostaniu się do cytoplazmy ulegają translacji w rybosomach, przy czym jedna kopia mRNA może stanowić matrycę dla kilkudziesięciu czy kilkuset cząsteczek białka.
- Kaskady sygnałowe - w rezultacie aktywacji pojedynczej kopii genu powstaje kilkadziesiąt - kilkaset kopii mRNA, a z nich kilkadziesiąt - kilkaset tysięcy kopii białka. Podobnie aktywna cząsteczka kinazy może służyć jako katalizator aktywacji kilkudziesięciu czy kilkuset cząsteczek kolejnych kinaz. Jeżeli będą one aktywowały następne kinazy, to niewielka początkowo ilość aktywnych kinaz pierwszego rodzaju skutkuje ogromną liczbą aktywnych kinaz na końcu łańcucha. Łańcuch kolejnych aktywacji prowadzący do efektu wzmocnienia sygnału nazywany jest kaskadą sygnałową.
- Pętle ujemnego i dodatniego sprzężenia zwrotnego - przepływ sygnału w komórce nie jest jednokierunkowy. Zazwyczaj w modułach regulatorowych jak na przykład w omówionych dalej modułach p53 czy NF- κ B występują liczne pętle sprzężeń zwrotnych zarówno ujemnych jak i dodatnich. Powszechnie występujące sprzężenia ujemne jak na przykład aktywacja przez czynnik transkrypcyjny genu swego inhibitora zapewniają homeostazę komórki (istnienie stanu stacjonarnego). Sprzężenia ujemne związane ze znacznymi opóźnieniami mogą prowadzić do występowania w komórce oscylacji (cykli granicznych). Sprzężenia dodatnie wzmacniające sygnał jak na przykład aktywacja przez czynnik transkrypcyjny genu kodującego inhibitor swego inhibitora wprowadzają do układów bistabilność, która umożliwia komórce podjęcie decyzji (na przykład apoptoza czy proliferacja).

2.4 Czynniki transkrypcyjne p53

Ludzkie białko p53 (oficjalna nazwa: cellular tumor antigen p53) składające się z 393 aminokwasów kodowane jest przez gen TP53 położony na chromosomie 17. Odkryte zostało w roku 1979 przez Lionela Crawforda, Davida Lane, Arnolda Levine'a i Lloyd Olda. Po raz pierwszy ludzki gen TP53 udało się sklonować w roku 1984. Początkowo sądzono, iż p53 sprzyja powstawaniu nowotworów i dopiero w 1989 roku Bert Vogelstein pokazał jego rolę przeciwdziałającą powstawaniu raka. Nazwa p53 pochodzi od jego masy molekularnej określanej na podstawie wędrówki po żelu w analizie SDS-PAGE wynoszącej 53 kDa (kilodaltony). W roku 1993 p53 zostało ogłoszone cząsteczką roku przez magazyn Science.

Białko p53 pełni rolę czynnika transkrypcyjnego, czyli cząsteczki wiążącej DNA w obszarze promotora, co umożliwia rozpoczęcie procesu transkrypcji genów. Zaangażowane jest w wiele procesów komórkowych, w szczególności w zatrzymanie cyklu komórkowego, procesy naprawcze DNA i proces apoptozy. Pełni ono rolę supresora nowotworowego uaktywniając się w momencie wykrycia uszkodzenia czy mutacji DNA i w razie niepowodzenia jego naprawy kierując komórkę na drogę samobójczej śmierci, dlatego zwane jest często "strażnikiem genomu".

Mutacja w genie kodującym p53 lub jego całkowity brak obserwowany jest w około połowie rodzajów nowotworów. Pozostała ich część w większości wykazuje nieprawidłowości w funkcjonowaniu białek zaangażowanych w moduł regulatorowy p53 (np. PTEN). Dziedziczne mutacje w genie TP53 są przyczyną zespołu chorobowego Li-Fraumeni, który znacznie zwiększa szanse zachorowania na raka przed 45 rokiem życia. Poznanie pełnego mechanizmu regulacji i działania p53 może się przyczynić do wynalezienia leków hamujących rozwój nowotworu i wymuszających śmierć zmutowanych komórek.

2.5 Czynniki transkrypcyjny NF- κ B

Czynnik transkrypcyjny NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) został odkryty w roku 1986 przez Davida Baltimore'a. Nazwa NF- κ B odnosi się do kompleksu białek zbudowanego z NF- κ B1 (p50) lub NF- κ B2 (p52) oraz RelA (p65), RelB lub c-Rel. Heterodimer p50|RelA(p65) jest najczęściej spotykaną formą i do niego odnosi się używając w rozprawie nazwy białko NF- κ B.

Białko NF- κ B pełni rolę czynnika transkrypcyjnego dla szeregu genów związanych między innymi z odpowiedzią komórki na bodźce zewnętrzne takie jak stres, cytokiny, wolne rodniki czy antygeny. Głównym jego zadaniem jest jednak regulacja wczesnej odpowiedzi immunologicznej na infekcje oraz regulacja genów odpowiedzialnych za procesy proliferacji i przeżycia komórki.

Mutacje genu NF- κ B bądź nieprawidłowości w układzie regulatorowym białka NF- κ B prowadzić mogą do zapaleń, chorób autoimmunologicznych, szoku septycznego, zmniejszenia odporności na infekcje wirusowe jak również do powstawania i rozwoju raka. Mutacja genu NF- κ B bądź jego inhibitora z rodziny I κ B prowadzi w komórkach nowotworowych do ciągłej aktywności białka NF- κ B, co umożliwia im proliferację. Dezaktywacja NF- κ B może doprowadzić do ich obumierania jak również zwiększyć ich wrażliwość na leki. Z tego powodu NF- κ B i jego moduł regulatorowy podobnie jak p53 ze swym układem regulacji są jednymi z najczęstszych obiektów badań związanych z rakiem.

2.6 Apoptoza

Termin apoptoza oznaczający zaprogramowaną śmierć komórki wprowadzony został dopiero w roku 1972, pomimo, że już w 1842 Carl Vogt opisał jej główne założenia. Apoptoza jest sposobem na pozbycie się przez tkankę starych bądź uszkodzonych komórek w sposób nie powodujący stanu zapalnego. W odróżnieniu od nekrozy (martwicy) w jej trakcie nie dochodzi do rozerwania błony komórkowej i wycieku wnętrza komórki. Przebiegiem procesu apoptozy sterują enzymy proteolityczne z grupy kaspaz. W jej trakcie chromatywa jądrowa ulega kondensacji, DNA zostaje pocięte przez nukleazy takie jak DFF czy CAD na kawałki o długości około 180 par zasad. W międzyczasie następuje niszczenie cytoszkieletu komórki. W rezultacie odrywa się ona od tkanki, a na jej powierzchni formują się charakterystyczne pęcherzyki, zwane ciałkami apoptotycznymi, zawierające w sobie nienaruszone organelle komórkowe. W końcowym etapie pęcherzyki odrywają się od pozostałości komórki i zostają pochłonięte przez fagocyty. Apoptoza może być indukowana na skutek pojawiania się nienaprawialnych uszkodzeń organelli komórkowych bądź zawartego w komórce DNA, infekcji wirusowej lub utrzymującego się stanu stresu czy niedożywienia. Sygnał inicjujący apoptozę pochodzić może z wnętrza komórki będąc reakcją

na uszkodzenie, od otaczającej komórkę tkanki, gdy komórka staje się w niej zbędna bądź od komórek immunologicznych, które skanując błonę komórkową sprawdzają czy badana komórka nie została zainfekowana i w przypadku wykrycia zagrożenia aktywują na niej tak zwany receptor śmierci.

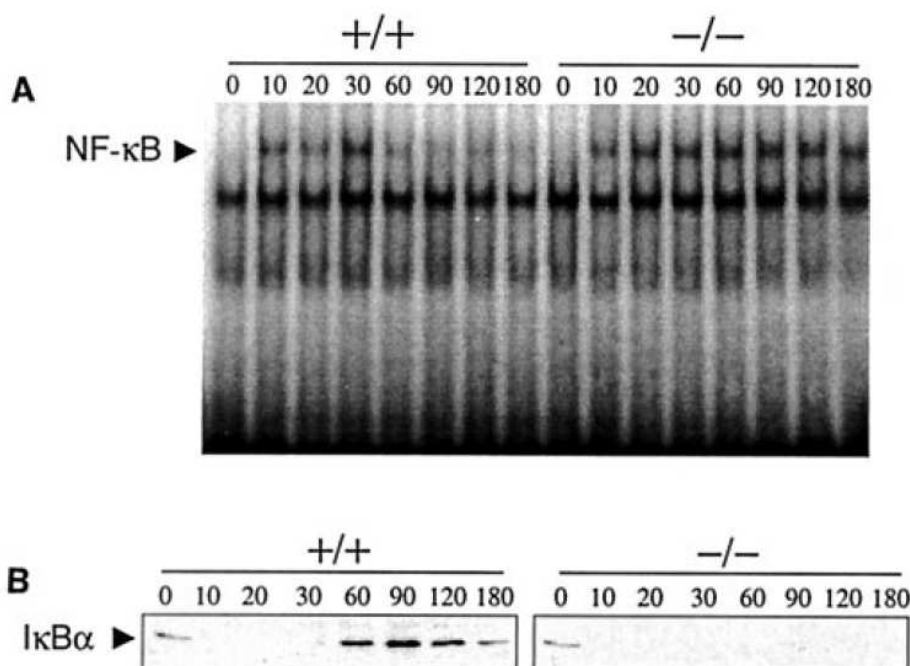
Każdego dnia w ciele dorosłego człowieka miliony komórek umierają drogą apoptozy umożliwiając odnawianie się tkanek. Równie ważną rolę odgrywa apoptoza w procesie kształtowania się organizmów jak na przykład w procesie rozdzielania się palców w kończynach człowieka. Zaburzenia procesu apoptozy prowadzą do zwiększenia odporności komórek na stres i są cechą charakterystyczną nowotworów. W komórkach rakowych poprzez mutację kluczowych białek zablokowana jest sama ścieżka apoptotyczna kaspaz bądź ścieżki sygnałowe indukujące sygnał apoptotyczny jak na przykład ścieżka p53. Powoduje to, że pomimo, iż DNA komórki zostaje znacznie zmienione w stosunku do stanu pierwotnego i komórka zaczyna zachowywać się w sposób zagrażający tkance jak i całemu organizmowi, to nie reaguje na sygnały próbujące zmusić ją do śmierci. Z powodu ewidentnego związku zaburzeń w procesie apoptozy z występowaniem nowotworów oraz teoretyczną możliwością uśmiercania komórek rakowych po usunięciu tych zaburzeń, programowana śmierć komórki znajduje się wśród najczęściej badanych mechanizmów biologicznych.

2.7 Dane eksperymentalne

Dane eksperymentalne, do których dopasowywane są modele szlaków sygnałowych, nie są danymi ilościowymi. Rezultaty często przedstawiane są w literaturze w postaci tak zwanych blotów (rysunek 2.1) bądź zdjęć ukazujących zmiany poziomów oznaczonych związkiem fluorescencyjnym białek (rysunek 2.2a). Obydwa sposoby przedstawiania danych dają obraz jakościowy charakteru odpowiedzi na zastosowany protokół wymuszeń. Prezentowane wykresy przebiegów zmienności poziomów białek jak na rysunku 2.2b odnoszone są do jednostek umownych. Z tak przedstawionych wyników można odczytać charakter zachowania się układu jak na przykład występowanie nietłumionych oscylacji, stałe czasowe takie jak okres drgań czy przesunięcie w fazie kolejnych zmiennych. Niemożliwe jest natomiast bezwzględne określenie stężenia czy ilości molekuł konkretnego białka w określonym czasie.

Dane zaprezentowane na rysunku 2.1 pochodzą z pracy Lee i in. [51]. Przedstawiają one zmiany poziomu NF- κ B (panel A) oraz I κ B α (panel B) w komórkach niezmodyfikowanych (+/+) i pozbawionych genu A20 (-/-), które poddano ciągłemu wymuszeniu za pomocą 10 ng/ml TNF α . Zmiany w poziomie czynnika transkrypcyjnego (panel A) zostały zmierzone przy użyciu techniki EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), zaś jego inhibitora (panel B) za pomocą Western-blot. Obydwie te techniki wykorzystują materiał pozyskany z frakcji komórek i wyniki uzyskane za ich pomocą są wynikami populacyjnymi. Eksperymenty populacyjne, pomimo, iż tańsze i dające wyniki mówiące o ogólnej tendencji komórek do pewnego typu zachowań nie są w stanie oddać zachowania się pojedynczej komórki. W skrajnym przypadku można sobie wyobrazić doświadczenie, w którym komórki dzielą się po równo na dwie frakcje, z których jedna posiada wysoki poziom pewnego białka, zaś druga niski. Analiza populacyjna sugerować będzie w tym przypadku istnienie średniego poziomu przedmiotowego białka w populacji, co jest wynikiem błędnym, nie oddającym faktycznego zachowania się żadnej z komórek. Podobnie oscylacje występujące w populacji na poziomie komórkowym w związku z desynchronizacją komórek dadzą przy

analizie populacyjnej wynik nie odzwierciedlający faktycznego ich zachowania [54].

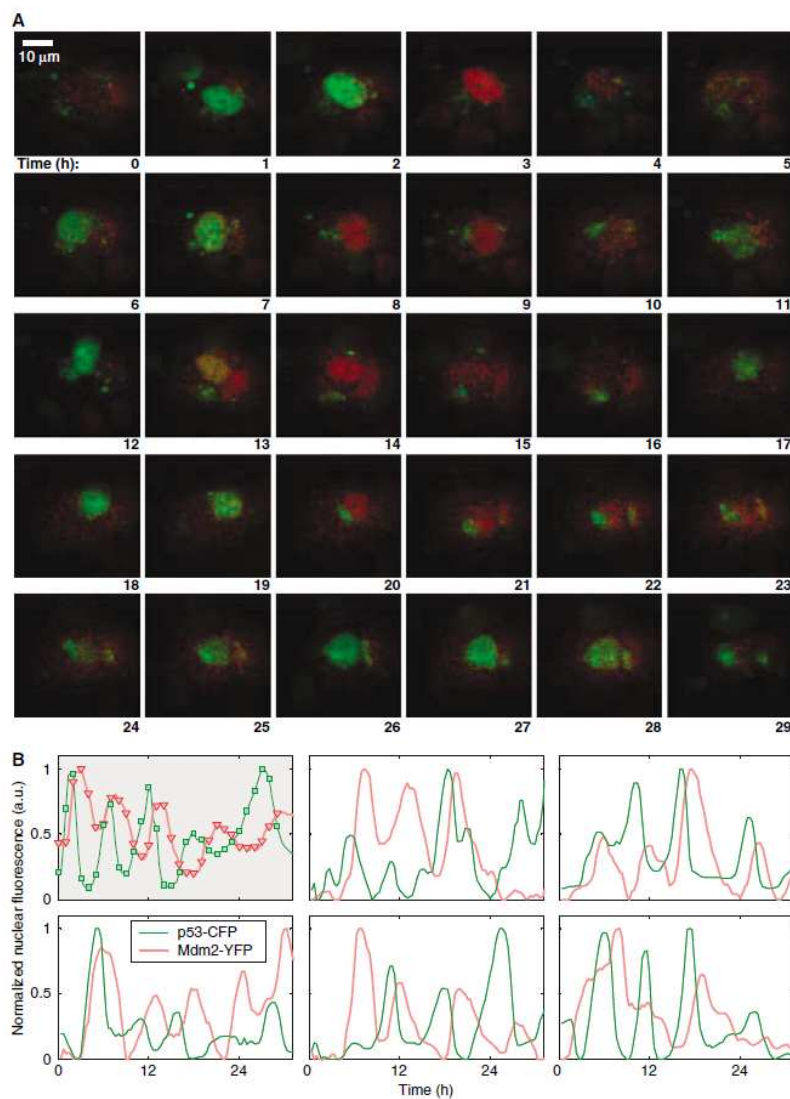


Rysunek 2.1: Dane z eksperymentu populacyjnego zaprezentowane przez Lee i in. w [51], uzyskane za pomocą techniki EMSA (panel A) bądź Western-blot (panel B). Panele A i B prezentują zmianę poziomów NF- κ B i I κ B α w komórkach poddanych ciągłemu wymuszeniu dawką 10 ng/ml TNF α , w których zablokowano (-/-) bądź nie (+/+) produkcje białka A20.

W odróżnieniu od powyższych wyników dane pokazane na rysunku 2.2 pochodzące z pracy Geva-Zatorsky i in. [24] obrazują odpowiedzi pojedynczych komórek na działanie bodźca jakim było naświetlenie dawką 5 lub 2.5 Gy. Wykorzystana w [24] technika eksperymentu zwana transfekcją polega na wprowadzeniu do komórki odpowiednio zmodyfikowanych kopii genów białek, które mają podlegać obserwacji. Do spreparowanych genów doczepiane są końcówki kodujące części fluorescencyjne. W przypadku prezentowanego eksperymentu zielonym fluorescentem oznaczono gen p53, a czerwonym Mdm2. Panel A przedstawia wyniki uzyskane dla przykładowej komórki przy wymuszeniu dawką 5 Gy. Pierwszy rysunek panelu B przedstawia zmiany poziomów oznaczonych białek dla komórki z panelu A, pozostałe rysunki przedstawiają kolejne badane komórki przy czym w ich przypadku zastosowano wymuszenie dawką 2.5 Gy. Jak widać odpowiedzi poszczególnych komórek posiadają ten sam typ jakościowy wyrażający się istnieniem nietłumionych oscylacji o okresie około 5.5 godziny i wyraźnym przesunięciem w oscylacjach p53 i Mdm2. Widoczna jest również desynchronizacja w odpowiedzi na ten sam bodziec pomiędzy komórkami 2-6 wynikającą z istniejących w układzie stochastyczności.

Pomimo, iż opisana powyżej technika pozwala na obserwację i pozyskanie wyników z pojedynczych komórek posiada dwie zasadnicze wady. Pierwsza z nich wynika ze sposobu zamiany informacji z kamery rejestrującej zmiany poziomów intensywności poszczególnych fluorescentów na odpowiednie wykresy. Operacja ta nie jest zautomatyzowana, lecz przeprowadzana przez człowieka, który obserwując kolejne zarejestrowane klatki filmu zaznacza

obszary z których odczytany ma być poziom intensywności świecenia. Powoduje to dość duże zniekształcenia faktycznego zachowania się komórki oraz utrudnienia w odtworzeniu otrzymanych wyników przez innych badaczy. Główną wadą metody jest pojawiająca się



Rysunek 2.2: Dane z eksperymentu Geva-Zatorsky i in. [24] na pojedynczych komórkach MCF7 uzyskane przy użyciu transfekcji genów ze znacznikiem fluorescencyjnym. Kolorem zielonym oznaczono białko p53, kolorem czerwonym Mdm2. Panel A i pierwszy rysunek panelu B przedstawiają tą samą komórkę poddaną promieniowaniu 5 Gy. Pozostałe rysunki panelu B przedstawiają odpowiedzi kolejnych komórek poddanych wymuszeniu 2.5 Gy.

przy transfekcji zmiana ilości kopii badanych genów. Nie zawsze istnieje możliwość wygasaenia niezmodyfikowanych kopii genu w jądrze komórkowym, czasami jest to zbyt trudne bądź kosztowne, podobnie jak dokładne określenie ilości wprowadzonych do komórki i aktywnych kopii zmodyfikowanego genu. Prowadzi to do sytuacji gdy komórka posiada więcej niż normalne dwa geny danego typu. Dodatkowo wprowadzone do komórki nadmiarowe kopie produkować będą białko oznaczone, zaś geny normalne białko nieoznaczone. Obydwa

jego rodzaje spełniają swoje normalne funkcje w organizmie, więc odczyt odpowiednich poziomów może być obarczony sporym błędem. Co więcej wprowadzenie dodatkowych kopii danego genu powoduje że jego produkcja jest kilkukrotnie szybsza niż w komórkach nie zmodyfikowanych, co prowadzi do zaburzeń w badanych szlakach i możliwe staje się, że obserwowany w eksperymencie efekt nie jest specyficzny dla zadanego wymuszenia i nie występuje w ogóle bądź nie z taką siłą w komórkach niezmienionych o których zachowaniu tak naprawdę chcemy wnioskować. Możliwa jest zatem sytuacja, w której obserwowane w układzie p53 oscylacje nie wynikają z rzeczywistej jego odpowiedzi na napromieniowanie, lecz są artefaktem metody [31].

Rozdział 3

Deterministyczne i stochastyczne modelowanie ścieżek regulatorowych

3.1 Streszczenie

Budowa modeli matematycznych wymaga stworzenia równań adekwatnych do wybranej metody modelowania jak na przykład algorytm Gillespiego czy modelowanie za pomocą ODE. Równania te powinny opierać się na znanych prawach i zależnościach, zaś parametry muszą pozwolić by model jak najlepiej odwzorowywał rzeczywistość, przy czym ich wartości nie mogą przekraczać fizycznych ograniczeń takich jak na przykład maksymalne tempo transkrypcji. Aparat numeryczny wykorzystany do znalezienia rozwiązania powinien zapewnić szybkie uzyskanie wyniku przy jednoczesnej minimalizacji błędów metody. Rozdział trzeci rozprawy poświęcony jest omówieniu podstawowych praw i zależności wykorzystanych przy budowie modeli opisanych w rozdziałach 5-7, przedstawieniu najpopularniejszych algorytmów modelowania jak i procedury znajdowania parametrów tworzonych modeli.

W drugiej części rozdziału trzeciego przedstawiono prawo działania mas, równanie Michaelisa-Menten oraz znaczenie współczynnika Hilla. Trzecia część rozdziału poświęcona jest odpowiedzi na pytanie o zasadność stosowania modeli stochastycznych lub deterministycznych. Część czwarta zawiera opisy najpopularniejszych rodzajów modelowania stochastycznego takich jak algorytm Gillespiego, jego modyfikacja τ -leap oraz zastosowane w pracy podejście zaproponowane przez Haseltine'a i Rawlingsa. Znajduje się w niej także opis sposobu uzyskiwania przybliżenia deterministycznego. Kolejna część omawia procedurę znajdowania wartości parametrów w trakcie dopasowywania modelu do danych zwaną potocznie fitowaniem (ang. fitting).

3.2 Podstawowe zależności wykorzystywane w modelowaniu

Modelowanie ścieżek sygnałowych opiera się na prawach znanych z biochemii. Reagujące ze sobą białka rozpatrywane są w ten sam sposób, co występujące w terminologii biochemicznej enzymy, produkty i substraty. Poniżej omówiłem główne zależności wykorzystywane w modelowaniu ścieżek sygnałowych.

Prawo działania mas

Podstawowe prawo używane w chemii, biochemii i modelowaniu szlaków sygnałowych. Pierwszy raz zaproponowane zostało w roku 1864 [92], często od nazwisk swych twórców zwane jest prawem Guldberga i Waagego. Zgodnie z nim, przy założeniu, że prawdopodobieństwo zderzeń reagujących ze sobą cząsteczek nie zależy od tego, co się z nimi działo wcześniej, a jedynie od ich obecnej ilości w jednostce objętości i średniej energii kinetycznej ich ruchu,

szybkość reakcji chemicznej jest proporcjonalna do stężenia wszystkich uczestniczących w niej reagentów.

Co wynika z faktu, iż szybkość reakcji zależy od ilości zderzeń reagujących ze sobą cząsteczek w jednostce czasu.

Z powyższego sformułowania wynikają dość oczywiste wnioski. Po pierwsze jeżeli stężenie któregoś z substratów jest zerowe, to reakcja nie zachodzi. Po drugie zwiększenie stężenia substratów powoduje przyspieszenie reakcji, podczas gdy zmniejszenie stężenia któregokolwiek z nich jej spowolnienie. Po trzecie, przy reakcjach równowagowych, gdy reakcja zachodzi w obie strony w układzie zamkniętym, to przyspieszenie jej w jednym kierunku na przykład poprzez użycie katalizatora powoduje automatyczne jej przyspieszenie w kierunku przeciwnym. Tym samym stężenie substratów i produktów w takim układzie jest stałe i nie można go zmienić przy użyciu katalizatorów.

W modelach stworzonych w ramach rozprawy wykorzystano dwa typy reakcji oparte o prawo działania mas: reakcje addycji oraz reakcje równowagową. Reakcja addycji to prosta reakcja łączenia się kilku substratów w jeden produkt finalny. Na przykład dwa białka A i B łączą się w finalny kompleks AB przy czym reakcja ta nie jest odwracalna (czyli kompleks AB nie rozpada się na A i B).



Tempo powyższej reakcji zależy od prawdopodobieństw efektywnych zderzeń A i B, co przy założeniu, iż prawdopodobieństwa te są proporcjonalne do aktywności chemicznych oddziałujących substratów można zapisać jako:

$$r = k \times A \times B \quad (3.2)$$

gdzie k to współczynnik szybkości reakcji, zaś r to tak zwana szybkość zaniku substratów A i B. Zakładając, iż kompleks AB nie ulega dalszym przemianom, rozpadowi czy degradacji można zapisać różniczkowe równanie szybkości jego powstawania. Będzie miało ono postać:

$$\frac{d}{dt}AB(t) = k \times A(t) \times B(t). \quad (3.3)$$

Reakcja równowagowa, to reakcja odwracalna, czyli taka, gdzie powstający z białek A i B kompleks AB może się ponownie rozpaść na pojedyncze cząsteczki A i B.

3.2. PODSTAWOWE ZALEŻNOŚCI WYKORZYSTYWANE W MODELOWANIU



co przy założeniu, iż białka A i B oraz kompleks AB nie biorą udziału w żadnych innych reakcjach daje równanie różniczkowe opisujące tempo zmian ilość kompleksu w postaci:

$$\frac{d}{dt}AB(t) = k_a \times A(t) \times B(t) - k_d \times AB(t) \quad (3.5)$$

gdzie k_a jest współczynnikiem szybkości reakcji powstawania kompleksów, zaś k_d współczynnikiem szybkości ich rozpadu.

Równanie Michaelisa-Menten

W roku 1913 Leonor Michaelis i Maud Menten zaproponowali opis reakcji katalitycznych (enzymatycznych), to jest takich, w których działanie enzymów powoduje ogromne przyśpieszenie przekształcania się substratów w produkt [65]. W opisie tym zakłada się, że produkt nie może być ponownie przekształcony w substraty oraz, że enzymy nie łączą się z produktem. Reakcja ma więc postać:



Oznaczając przez k_1 tempo powstawania kompleksu ES , przez k_2 powstawania produktu P i enzymu E z kompleksu ES oraz przez d_1 tempo rozpadu kompleksu ES na enzym i substraty S możemy zapisać różniczkowe równanie opisujące tempo zmian ilości kompleksu ES

$$\frac{d}{dt}ES(t) = k_1 \times E(t) \times S(t) - d_1 \times ES(t) - k_2 \times ES(t) \quad (3.7)$$

zakładając następnie, iż koncentracja kompleksów ES zmienia się dużo wolniej niż koncentracja substratów i produktu, a także, iż ilość substratów jest na tyle duża, że można zaniedbać ich ubytek w wyniku reakcji oraz, iż ilość enzymu w trakcie trwania reakcji się nie zmienia, czyli:

$$\frac{d}{dt}ES(t) = 0 \quad (3.8)$$

$$\frac{d}{dt}S(t) = 0 \quad (3.9)$$

$$E_{tot} = E(t) + ES(t) = const \quad (3.10)$$

otrzymujemy

$$0 = k_1 \times (E_{tot} - ES(t)) \times S(t) - (d_1 + k_2) \times ES(t), \quad (3.11)$$

co po przekształceniach daje

$$S(t) \times E_{tot} = S(t) \times ES(t) + ES(t) \times \frac{d_1 + k_2}{k_1}. \quad (3.12)$$

Wprowadzając

$$k_M = \frac{d_1 + k_2}{k_1} \quad (3.13)$$

oznaczając stałą Michaelisa-Menten oraz przekształcając równanie 3.12 do postaci

$$S(t) \times E_{tot} = (k_M + S(t)) \times ES(t) \quad (3.14)$$

otrzymujemy

$$ES(t) = \frac{S(t) \times E_{tot}}{k_M + S(t)}, \quad (3.15)$$

co po podstawieniu do zależności wyrażającej tempo zmiany ilości produktu

$$\frac{d}{dt}P(t) = k_2 \times ES(t) = v_0 \quad (3.16)$$

daje równanie wyrażające szybkość reakcji v_0 (powstawania produktu P) w zależności od stężenia substratów zwane równaniem Michaelisa-Menten:

$$v_0 = v_{max} \times \frac{S(t)}{k_M + S(t)} \quad (3.17)$$

gdzie $v_{max} = k_2 \times E_{tot}$ oznacza maksymalną możliwą prędkość tej reakcji, zaś stała k_M może być interpretowana jako stężenie substratu, przy którym reakcja osiąga połowę swej maksymalnej prędkości.

Współczynnik Hilla

W roku 1910 Archibald Vivian Hill badając proces przyłączania się cząsteczek tlenu do hemoglobiny zauważył, że jeżeli wiele cząsteczek hemoglobiny skupi się ze sobą, to przyłączanie tlenu jest wydajniejsze [33]. Podobne zachowanie jak i proces odwrotny polegający na osłabieniu reakcji przy zwiększającym się skupieniu jednego z reagentów obserwowane jest w wielu procesach. W celu opisu tej zależności stosuje się wprowadzony przez Hilla współczynnik (n) nazwany jego nazwiskiem. Wartość współczynnika Hilla równa 1 oznacza całkowicie niezależne przyłączanie się ligandu, wartość współczynnika większa od jedności oznacza działanie pozytywne w sensie zwiększania się przyczepności ligandu w obecności innych ligandów, zaś wartość współczynnika mniejsza od jedności działanie osłabiające przyczepność. Ogólnie równanie opisujące ilość zajętych przez ligand miejsc (Q) wykorzystujące współczynnik Hilla nazywa się równaniem Hilla i ma ono postać:

$$Q = \frac{L^n}{k^n + L^n} \quad (3.18)$$

gdzie L oznacza koncentrację ligandu, zaś k taką jego koncentrację, przy której zajęta jest połowa miejsc przyłączeniowych. Jak można zauważyć przy $n = 1$ i wprowadzeniu odpowiedniego współczynnika postać równania Hilla odpowiada równaniu Michaelisa-Menten.

3.3 Modelowanie stochastyczne czy deterministyczne ?

Żywą komórkę można rozpatrywać jako złożony reaktor biochemiczny, w którym oddziałują ze sobą cząsteczki białek zgodnie ze specyficznymi dla nich regułami reakcji. Tempa samych oddziaływań uzależnione są od stężenia reagujących ze sobą składników jak również od warunków środowiska, które mogą być prezentowane w równaniach przez współczynniki reakcji. Ogólnie każde zachodzące w badanym reaktorze zjawisko jak np. połączenie się po jednej cząsteczce dwu substratów w jedną cząsteczkę produktu powinno być traktowane jako zdarzenie losowe. Prawdopodobieństwo zajścia takiego zdarzenia, a co za tym idzie również sama chwila jego zajścia ściśle związane są ze wspomnianymi parametrami. Co więcej pojedyncze zdarzenie losowe jak na przykład aktywacja jednej kopii genu prowadzić może do powstania z niego kilkudziesięciu tysięcy kopii odpowiedniego białka czego wpływ na komórkę będzie ogromny. Sam opis stochastyczny skomplikowanych układów jak na przykład rozbudowane ścieżki sygnałowe nastęrcza jednak pewnych trudności, dodatkowo uzyskany model stochastyczny jest ciężki w analizie. Problematiczne jest odwoływanie się w niej do pojęć znanych z układów deterministycznych takich jak punkty stabilne czy cykle graniczne, które to pojęcia wykorzystano w analizie budowanych modeli w dalszych rozdziałach. Z tych powodów pożądana byłaby możliwość opisu zachowania się badanego układu przy pomocy jedynie równań różniczkowych i uzyskanie w ten sposób modelu deterministycznego. Oprócz wspomnianej wyżej łatwości analizy i możliwości odwoływania się w niej do znanych pojęć, modele deterministyczne umożliwiają dokonanie analizy bifurkacyjnej (wykorzystanej przez nas do badania odporności modeli ścieżki sygnałowej p53|Mdm2 przedstawionej w Hat i in. [31]) oraz charakteryzują się znacznie większą szybkością działania niż modele stochastyczne. Modelowanie deterministyczne posiada jednak zasadniczą wadę. Jak można zauważyć w wielu eksperymentach jak na przykład w [24] poszczególne komórki należące do tej samej tkanki wykazują zróżnicowaną odpowiedź na dokładnie ten sam bodziec zewnętrzny. Odpowiedź ta może diametralnie się różnić pomiędzy komórkami jak na przykład odpowiedź na uszkodzenie DNA powstałe na skutek promieniowania IR może przyjąć formę przeżycia bądź apoptozy, czyli samobójczej śmierci. Opis deterministyczny w swej specyfice nie pozwala na uzyskanie zróżnicowanych odpowiedzi przy założeniu tych samych warunków początkowych, parametrów i takiej samej wartości pobudzenia. Interpretacja wyniku uzyskanego z modelu deterministycznego jako średnie zachowanie się komórek może okazać się mylna i takie średnie zachowanie z powodu desynchronizacji występującej pomiędzy pojedynczymi komórkami tak naprawdę nie będzie oddawało żadnego z obserwowanych doświadczalnie zachowań [55]. Zatem gdy zależy nam na opisie zachowania się pojedynczych komórek, wykazujących duże zróżnicowanie w odpowiedzi na bodźce, koniecznym staje się stosowanie modeli stochastycznych. W celu odwoływania się w analizie tych modeli do pojęć znanych z układów ciągłych dobrze jest

posiadać przybliżenie deterministyczne badanego modelu stochastycznego. Takie podejście zastosowałem w niniejszej rozprawie.

3.4 Algorytmy stochastyczne i przybliżenie deterministyczne

Powszechnie stosowanym algorytmem służącym do modelowania procesów stochastycznych zachodzących w komórkach jest algorytm Gillespiego. Jest to w pełni stochastyczne podejście do modelowania, co pociąga za sobą duże obciążenie obliczeniowe i wynikającą stąd czasochłonność obliczeń. Z tego powodu powstały liczne modyfikacje mające na celu jego przyspieszenie. Sam algorytm oraz wybrane usprawnienia, łącznie z podejściem stosowanym w rozprawie omówiłem poniżej.

Algorytm Gillespiego

Zanim Dan Gillespie opublikował w roku 1977 pracę prezentującą jego algorytm symulacji reakcji chemicznych stosowano tradycyjną metodę wyznaczania zmian stanu takiego układu w czasie. Polega ona na zbudowaniu równania głównego (ang. master equation), a następnie jego rozwiązaniu. W takim podejściu system opisywany jest przez zbiór równań różniczkowych, w których zmiennymi są prawdopodobieństwa znajdowania się układu w danym czasie w określonym stanie. Każdy możliwy stan układu wymaga oddzielnej zmiennej, więc układ równań gwałtownie rozrasta się w miarę jak zwiększa się liczba rodzajów związków biorących udział w reakcji jak i cząsteczek każdego z tych związków. Rozwiązanie takiego układu okazuje się bardzo trudne. Gillespie zaproponował by symulować tylko jedną trajektorię systemu, a następnie użyć statystyki do estymacji koncentracji cząsteczek [25]. W ujęciu Gillespiego symulacja stochastyczna służy do opisanie zmian w czasie wektora stanu $S(t)$ przy założeniu stanu początkowego $S(0)$. W każdym kroku symulacji układ znajduje się w dokładnie jednym określonym stanie, w którym należy podjąć dwie decyzje:

- po jakim czasie od chwili obecnej zajdzie następna reakcja
- która z możliwych reakcji zajdzie w tym czasie

By odpowiedzieć na powyższe pytania Gillespie definiuje funkcję gęstości prawdopodobieństwa reakcji $P(\mu, \tau)$:

$P(\mu, \tau) d\tau$ jest prawdopodobieństwem, iż reakcja R_μ zajdzie w nieskończenie małym przedziale czasu $(t + \tau, t + \tau + d\tau)$ zakładając, że w czasie t system znajduje się w stanie $S(t)$

Warto zauważyć, że funkcja gęstości $P(\mu, \tau)$ z założenia jest proporcjonalna jedynie do $d\tau$. Prawdopodobieństwo $P(\mu, \tau) d\tau$ oblicza się z zależności:

$$P(\mu, \tau) d\tau = P_0(\tau) P_\mu(d\tau) \quad (3.19)$$

gdzie

$$P_\mu(d\tau) = a_\mu d\tau \quad (3.20)$$

jest prawdopodobieństwem tego, iż reakcja R_μ zajdzie w przedziale czasu $(t + \tau, t + \tau + d\tau)$, zaś a_μ oznacza skłonność (ang. propensity) zajścia reakcji μ . $P_0(\tau)$ jest prawdopodobieństwem, że przy danym w chwili t stanie $S(t)$ żadna z reakcji nie zajdzie w przedziale czasu $(t, t + \tau)$. Bazując na powyższym, prawdopodobieństwo, że którakolwiek z możliwych M reakcji zajdzie we wspomnianym przedziale czasu wynosi

$$P^*(d\tau) = \sum_{\mu=1}^M a_\mu d\tau = a^* d\tau \quad (3.21)$$

Tak więc prawdopodobieństwo, iż w przedziale $d\tau$ nie zajdzie żadna reakcja wynosi $1 - a^* d\tau$ stąd

$$P_0(\tau + d\tau) = P_0(\tau) (1 - a^* d\tau), \quad (3.22)$$

co można przedstawić w postaci równania różniczkowego jako

$$\frac{dP_0}{d\tau} = -a^* P_0, \quad (3.23)$$

którego rozwiązanie ma postać

$$P_0(\tau) = e^{-a^* \tau} \quad (3.24)$$

Bazując na powyższych równaniach, z rozkładu łącznego można otrzymać prawdopodobieństwo, że którakolwiek z możliwych reakcji zajdzie w przedziale czasu $(t + \tau, t + \tau + d\tau)$ sumując równanie 3.19 po wszystkich reakcjach

$$P(\tau) d\tau = \sum_{\mu=1}^M P(\mu, \tau) d\tau = a^* e^{-a^* \tau} d\tau \quad (3.25)$$

Warto zauważyć, iż równanie 3.25 daje nam prawdopodobieństwo, że którakolwiek z reakcji zajdzie w przedziale czasu $d\tau$, a nie w określonym czasie. stąd potrzeba założenia, iż $d\tau$ jest pomijalnie małe. Daje to podstawę do wyznaczenia dokładnego, czasu kiedy zajdzie kolejna reakcja.

Prawdopodobieństwo, że reakcja która zajdzie w czasie τ będzie typu μ jest prawdopodobieństwem warunkowym $P(\mu, \tau)$ i jako takie wyraża się wzorem:

$$P(\mu|\tau) = \frac{P(\mu, \tau)}{P(\tau)} = \frac{a_\mu e^{-a^* \tau}}{a^* e^{-a^* \tau}} = \frac{a_\mu}{a^*} \quad (3.26)$$

Równania 3.25 oraz 3.26 dają nam prawdopodobieństwa odpowiadające na pytania kiedy zajdzie następna reakcja i jakiego typu ta reakcja będzie.

W celu ujęcia powyższych równań w algorytm obliczeniowy potrzebne są kolejne przekształcenia. Chcąc wyznaczyć dokładny czas, w którym zajdzie kolejna reakcja, trzeba skorzystać z funkcji gęstości prawdopodobieństwa dla równania 3.25, która ma postać

$$P(\tau) = a^* e^{-a^* \tau} \quad (3.27)$$

stąd jej dystrybuanta zdefiniowana jest jako

$$F(t) = \int_{-\infty}^t P(\tau) d\tau = a^* \int_0^t e^{-a^* \tau} d\tau = 1 - e^{-a^* t} \quad (3.28)$$

Mając dana liczbę r_1 wylosowaną z rozkładu równomiernego z przedziału $\langle 0, 1 \rangle$, chcąc wybrać czas t tak by $F(t) = r_1$ i korzystając z faktu, iż postać funkcji gęstości dla t będzie taka jak w równaniu 3.27, można wyznaczyć wartość t z zależności:

$$t = F^{-1}(r_1) = \frac{1}{a^*} \ln \left(\frac{1}{1 - r_1} \right) \quad (3.29)$$

Liczba r_1 pochodzi z rozkładu równomiernego z przedziału $\langle 0, 1 \rangle$, więc wyrażenie $1 - r_1$ może zostać zastąpione przez r_1 , co daje nam czas τ do następnej reakcji równy:

$$\tau = \frac{1}{a^*} \ln \left(\frac{1}{r_1} \right) = -\frac{1}{a^*} \ln r_1 \quad (3.30)$$

Typ reakcji jaka zajdzie w tak ustalonym czasie można określić korzystając z zależności 3.26. Jeżeli wylosowana zostanie liczba r_2 z rozkładu równomiernego z przedziału $\langle 0, 1 \rangle$, to typ reakcji która zajdzie w chwili τ odpowiada takiemu μ , które spełnia nierówność:

$$\sum_{j=1}^{\mu-1} \frac{a_j}{a^*} \leq r_2 < \sum_{j=1}^{\mu} \frac{a_j}{a^*} \quad (3.31)$$

Przy powyższych przekształceniach można już sformułować algorytm Gillespiego:

1. Ustal $t = 0$ oraz początkowe ilości wszystkich cząsteczek biorących udział w reakcji. Zainicjuj generator liczb pseudolosowych
2. Dla danego czasu t oraz ilości molekuł przelicz wszystkie funkcje skłonności a_μ oraz wyznacz $a^* = \sum_{\mu=1}^M a_\mu$
3. Wylosuj dwie liczby r_1 i r_2 z rozkładu równomiernego z przedziału $\langle 0, 1 \rangle$. Znajdź $\tau = (1/a^*) \ln(1/r_1)$ oraz takie μ , które spełnia nierówność: $\sum_{j=1}^{\mu-1} a_j \leq r_2 a^* < \sum_{j=1}^{\mu} a_j$
4. Zmień ilości molekuł zgodnie z schematem wylosowanej reakcji R_μ , podstaw czas $t = t + \tau$
5. Sprawdź czy osiągnięto czas T końca symulacji lub czy wszystkie $a_\mu = 0$, jeżeli tak,

zakończ obliczenia, jeżeli nie, wróć do punktu 2.

Modyfikacja τ – leap

Podstawowy algorytm Gillespiego, pomimo, iż w sposób znaczący ułatwia rozwiązanie problemu modelowania stochastycznego posiada również zasadniczą wadę. Po wylosowaniu czasu zajścia następnej reakcji τ oraz typu reakcji która zajdzie określanego przez μ przeprowadza się dokładnie jedną reakcję wylosowanego typu. Przykładowo jeżeli posiadamy sto tysięcy cząsteczek A i sto tysięcy cząsteczek B , które w reakcji R_μ łączą się z sobą tworząc kompleks AB , to jeżeli reakcja μ okaże się reakcją zwycięską, to w chwili $t + \tau$ dokładnie jedna cząsteczka A połączy się z jedną cząsteczką B tworząc jeden kompleks AB . Zakładając więc nieodwracalność tej reakcji oraz brak innego typu reakcji w systemie, do pełnego przereagowania A i B potrzeba sto tysięcy kroków algorytmu Gillespiego w jego formie podstawowej. Jest to przyczyną dużego obciążenia obliczeniowego algorytmu. Gillespie [26] zauważa, że przy założeniu dużej ilości cząsteczek A i B w systemie stan układu między chwilami t i $t + \tau$ zmienia się minimalnie. Zakładając dodatkowo, że reakcja zachodzi szybko, to znaczy skłonność do zajścia reakcji jest bardzo wysoka na mocy 3.30 uzyskujemy czas τ dążący do zera. Tak więc po wykonaniu pojedynczego kroku algorytmu układ znajduje się w przybliżeniu w tym samym stanie co przed jego wykonaniem. W związku z tym prawdopodobieństwa typów reakcji w następnym kroku są podobne do tych w kroku poprzednim. Przejścia pomiędzy kolejnymi stanami układu mają charakter procesu Markowa, więc w danej chwili t do wykonania kolejnego kroku nie musimy znać dokładnej kolejności zachodzenia poprzednich reakcji. Do poznania bieżącego stanu układu wystarczy informacja ile razy każda z reakcji zaszła od chwili startu obliczeń (przy znajomości warunków początkowych). Bazując na powyższych spostrzeżeniach Gillespie zaproponował w roku 2001 modyfikację swojego algorytmu zwaną τ -leap [26]. Zakłada ona omijanie niektórych stanów w trakcie symulacji i estymowanie ilości reakcji jaka w zaszła w pominiętym czasie na podstawie rozkładu Poissona. Dokładność estymacji opiera się na wspomnianych założeniach o niezmienności funkcji skłonności w układzie. Oczywiście w miarę wydłużania się skoku, a tym samym ilości reakcji jakie zaszły w międzyczasie założenie to przestaje być prawdziwe, co wynika z faktu, iż wartości funkcji skłonności zależą od liczby reagujących ze sobą cząsteczek. W celu przyspieszenia algorytmu należy zmaksymalizować długość skoku τ , więc optymalnym rozwiązaniem będzie znalezienie największego możliwego τ , które w przedziale $< t, t + \tau >$ nie powoduje znaczącej zmiany żadnej z funkcji skłonności w układzie. Warunek ten zwany jest przez Gillespiego warunkiem skoku. W skrócie algorytm po modyfikacji τ -leap wygląda następująco:

1. Dla danego układu w chwili t znajdź czas τ spełniający warunek skoku
2. Korzystając z rozkładów Poissona wylosuj liczbę reakcji każdego typu jaka zaszła w przedziale czasu $< t, t + \tau >$
3. Zmień stan układu zgodnie ze schematami reakcji, podstaw $t = t + \tau$ i wróć do kroku 1.

Dokładna procedura wyznaczania czasu τ opisana jest w [26]. Warto zauważyć, że jeżeli ilość reagujących molekuł w układzie jest niewielka, rzędu kilkunastu, kilkudziesięciu cząsteczek, to każda zmiana ich liczby będzie miała wpływ na funkcje skłonności, co w skrajnym przypadku prowadzi do długości kroku τ równemu czasowi do zajścia kolejnej

reakcji i algorytm τ -leap staje się równoważny algorytmowi podstawowemu.

Algorytm Haseltine'a i Rawlingsa

W roku 2002 Eric Haseltine i James Rawlings zaproponowali swoją modyfikację podstawowego algorytmu Gillespiego [30]. Modyfikacja ta zakłada podzielenie wszystkich typów reakcji zachodzących w układzie na dwie grupy, tak zwanych reakcji szybkich i reakcji wolnych. Zgodnie z prawem działania mass tempo reakcji zależy od stężenia reagujących ze sobą substratów, co można rozumieć również tak, iż skłonność (ang. propensity) danej reakcji jest tym większa, im więcej jest cząsteczek substratów tej reakcji. Reakcjami szybkimi są zatem te reakcje, w których liczba reagujących cząsteczek jest bardzo duża, rzędu dziesiątek czy setek tysięcy. W takim przypadku odchyłka rzędu kilku, kilkunastu reakcji, które zaszły do czasu t ma niewielki wpływ na wartość funkcji skłonności reakcji w danym czasie. Długość kroku τ do zajścia kolejnej reakcji jest również niewielka, więc można z dużą dokładnością przybliżyć stochastyczny proces reakcji zależnością deterministyczną wyrażoną równaniem różniczkowym zwyczajnym (ODE). W przypadku reakcji, w których liczba reagentów jest niewielka ich funkcja skłonności również przyjmuje niewielkie wartości, więc reakcje te będą zachodzić wolno, z dużymi odstępami τ pomiędzy kolejnymi zdarzeniami. Powoduje to, iż przybliżenie deterministyczne wolnych reakcji obciążone będzie sporym błędem. Reagujących cząsteczek jest w nich niewiele, rzędu kilku, kilkunastu do kilkudziesięciu, więc odchyłka w ilości dokonanych reakcji rzędu kilku-kilkunastu zdarzeń ma spory wpływ na wartość funkcji skłonności w danym czasie. Stąd też zastosowanie w przypadku tych reakcji przybliżenia za pomocą równań różniczkowych zwyczajnych jest niewskazane. Wykorzystując powyższe spostrzeżenia Haseltine i Rawlings przedstawili algorytm, który można w skrócie opisać następująco:

1. Mając dany układ rozdziel wszystkie reakcje w nim zachodzące na wolne i szybkie. Opisz szybkie reakcje za pomocą ODE
2. Dla danego czasu t oraz danej ilości molekuł przelicz wszystkie funkcje skłonności $a_\mu(t)$ dla wolnych reakcji oraz całkowitą funkcję skłonności

$$a^*(t) = \sum_{\mu=1}^M a_\mu(t) \quad (3.32)$$

3. Wylosuj dwie liczby r_1 i r_2 z rozkładu równomiernego z przedziału $\langle 0, 1 \rangle$
4. Rozwiąż układ ODE dla szybkich reakcji od czasu t do czasu $t + \tau$ takiego, że:

$$\log(r_1) + \int_t^{t+\tau} a^*(s) ds = 0. \quad (3.33)$$

5. Wyznacz który typ (μ) wolnych reakcji zajdzie w czasie $t + \tau$ korzystając z nierówności:

$$\sum_{j=1}^{\mu-1} a_j(t + \tau) \leq r_2 a^*(t + \tau) < \sum_{j=1}^{\mu} a_j(t + \tau) \quad (3.34)$$

gdzie $a_j(t + \tau)$ oznacza funkcje skłonności poszczególnych wolnych reakcji, a μ indeks zwycięskiej reakcji.

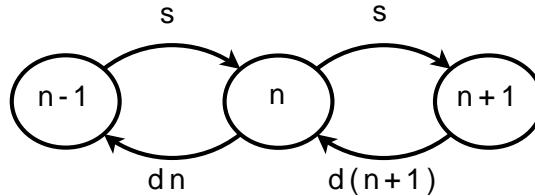
6. Zmień ilość molekuł zgodnie regułami zwycięskiej reakcji μ . Jeżeli nie osiągnięto warunków stopu podstaw $t = t + \tau$ i wróć do punktu 2

Powyższy algorytm wykorzystałem w rozprawie do przeprowadzenia symulacji zbudowanych modeli stochastycznych.

Przybliżenie deterministyczne

Przybliżenie deterministyczne stworzonych modeli stochastycznych najprościej uzyskać przez zastąpienie opisu stochastycznego równaniami różniczkowymi zwyczajnymi opisującymi zmianę ilości badanych molekuł w czasie.

Rozpatrzmy proces produkcji mRNA z aktywnego genu. Ilość kopii mRNA w chwili $t + \delta t$ może zwiększyć się na skutek syntezy bądź zmniejszyć na skutek degradacji. Załóżmy, że w danej chwili układ znajduje się w stanie n oznaczającym ilość kopii mRNA. Stan ten może być osiągnięty w wyniku syntezy dodatkowej molekuly mRNA o ile układ znajdował się wcześniej w stanie $n - 1$ bądź w wyniku degradacji jednej molekuly mRNA jeżeli układ znajdował się w stanie $n + 1$. Stan n układu może zostać opuszczony w wyniku syntezy (układ przejdzie do stanu $n + 1$) bądź degradacji (układ przejdzie do stanu $n - 1$) jak pokazano na rysunku 3.1. Tempo syntezy nie zależy od stanu układu i wynosi



Rysunek 3.1: n - ilość kopii mRNA, s - tempo syntezy, d - tempo degradacji

s , tempo degradacji zależy od stanu układu i wyraża się iloczynem współczynnika d i ilości kopii mRNA w danym stanie (na przykład dn dla stanu n). Oznaczając przez x_n prawdopodobieństwo, iż układ w chwili t znajduje się w stanie n możemy przedstawić jego równanie master:

$$\frac{d}{dt}x_n = s x_{n-1} + d x_{n+1} (n + 1) - s x_n - d x_n n. \quad (3.35)$$

Stacjonarna gęstość prawdopodobieństwa powyższego równania wyraża się rozkładem Poissona o średniej $\lambda = s/d$:

$$P = \frac{e^{-\lambda} \lambda^n}{n!} \quad (3.36)$$

w rozkładzie Poissona średnia równa jest wariancji, a więc szum σ zdefiniowany jako stosunek odchylenia standardowego do średniej wyrazi się zależnością:

$$\sigma = \frac{\sqrt{\lambda}}{\lambda} = \frac{1}{\sqrt{\lambda}}. \quad (3.37)$$

Zgodnie z powyższym równaniem szum maleje wraz ze średnią ilością cząsteczek, więc w przypadku gdy średnia ta jest dostatecznie duża, uzasadnione jest przybliżenie deterministyczne wyrażające zmianę ilości cząsteczek mRNA w postaci:

$$\frac{d}{dt}n = s - dn, \quad (3.38)$$

w którego stanie ustalonym ilość cząsteczek n równa jest średniej λ z rozkładu Poissona.

Powyższe spostrzeżenie wykorzystałem w rozprawie do tworzenia przybliżeń deterministycznych. Stacjonarne gęstości prawdopodobieństw dla bardziej skomplikowanych reakcji nie wyrażają się rozkładem Poissona. Przyjąłem jednak, że wartość szumu w tych reakcjach również maleje wraz ze wzrostem średniej ilości cząsteczek. Liczba kopii mRNA czy białek w stworzonych modelach jest dużo większa od jedności, więc takie przybliżenie wydaje się racjonalne.

3.5 Procedura dopasowania modelu do danych

Budowa modelu wymaga oprócz określenia substratów biorących udział w reakcjach, podania również tempa tych reakcji. Wartości te tworzą zbiór parametrów modelu. Wartości niektórych elementów tego zbioru zostały wyznaczone eksperymentalnie i mogą zostać odnalezione w literaturze. Dla części parametrów mogą być znane granice w których powinny się one znajdować. Przykładowo maksymalna wydajność transkrypcji mRNA z jednej kopii genu wynosi około 0.16 mRNA/s, co wynika z prędkości przesuwania się polimerazy RNA po nici DNA wynoszącej 40 nukleotydów (nt) na sekundę oraz minimalnej odległości pomiędzy kolejnymi polimerazami wynoszącej 250 nt ($v=40/250=0.16$) [52]. Podobnie maksymalna wydajność translacji z jednej nici mRNA w pojedynczym rybosomie wynosi 15 aminokwasów (a.a.) na sekundę, co przy dziesięciu jednocześnie pracujących na niej rybosomach daje nam 150 a.a. na sekundę. Przyjmując długość pojedynczego białka na poziomie 300 a.a. (przykładowo białko I κ B α u człowieka ma długość 317 a.a.) otrzymujemy maksymalną wydajność translacji z jednej kopii mRNA równą 0.5 białka/s [52]. Niestety dla większości parametrów nie są znane ani dokładne wartości ani też granice w jakich powinny się one znajdować i w trakcie budowy modelu parametry te muszą zostać oszacowane. Zmiana ich wartości pociąga za sobą zmiany w zachowaniu się budowanego modelu, więc dobiera się je tak, by uzyskana dynamika odwzorowywała znane z eksperymentów zachowania układu.

Możliwe są dwa zasadnicze podejścia do dopasowywania modelu. Pierwsze z nich zakłada jak najlepsze dopasowanie modelu do konkretnego eksperymentu (stosowane między innymi przez grupę Hoffmana), drugie zakłada takie dobranie parametrów, by charakter zachowania modelu przy różnych wymuszeniach zgadzał się ze znanymi eksperymentami, przy czym nie musi być on do nich dokładnie dopasowany. Wadą podejścia pierwszego jest to, że model dokładnie dopasowany do jednego eksperymentu nie posiada w ogólnym przypadku zdolności generalizacji, to znaczy nie będzie w stanie w sposób prawidłowy oddać zachowania się obserwowanego układu przy eksperymentach z innym protokołem wymuszenia bądź wyciszeniem niektórych genów. Model dopasowany według podejścia drugiego nie oddaje dokładnie żadnego z eksperymentów w sensie stosunków ilościowych, jednak

oddaje prawidłowo charakter odpowiedzi układu przy różnych protokołach eksperymentu. Wyniki kolejnych powtórzeń doświadczeń biologicznych różnią się zazwyczaj ilościowo, są jednak zgodne jeżeli idzie o charakter odpowiedzi układu, więc wydaje się, iż takie podejście jest uzasadnione i prowadzi do budowy modeli lepiej oddających rzeczywistość. Drugie z omówionych tu podejść zostało zastosowane w dopasowywaniu modeli stworzonych w ramach rozprawy (model p53 i model łączny) jak i modelach Lipniackiego i in. (NF- κ B) [56].

W przypadku szukania parametrów modelu deterministycznego, zwłaszcza przy zastosowaniu pierwszego z podejść możliwe jest stworzenie algorytmu znajdowania optymalnego dopasowania modelu do danych w sensie wskaźnika jakości jak pokazali na przykład Fujiarzewicz i in. w [21]. Jednakże, jeżeli chcemy uzyskać dopasowanie modelu do kilku różnych eksperymentów, a dodatkowo rozważamy model stochastyczny koniecznym staje się ręczne dobranie wartości parametrów.

Procedurę dopasowywania modeli w ogólnym przypadku rozpoczynano od ich przybliżenia deterministycznego, co wynikało z faktu, że modele dopasowywane były częściowo do danych z eksperymentów populacyjnych. Odtworzenie ich przez model stochastyczny wymagałoby wielokrotnego powtórzenia symulacji pojedynczej komórki w celu znalezienia trajektorii oddającej średnie zachowanie populacji komórek, a więc dużą czasochłonność. Ponadto ponieważ modele stochastyczne budowane były zgodnie z postulatem Haseltine'a i Rawlingsa, to znaczna część ich równań ODE posiada dokładnie tę samą formę co równania przybliżenia deterministycznego. Po dopasowaniu przybliżenia deterministycznego przyjmowano wartości jego parametrów jako wyjściowe do dostrojenia w modelu stochastycznym. Zastosowany algorytm dopasowywania można w sposób uproszczony przedstawić w następujących krokach:

1. Przyjmij rozsądne w rozumieniu intuicyjnym wartości wyjściowe parametrów przybliżenia deterministycznego.
2. Znajdź parametry przybliżenia deterministycznego najlepiej oddające wszystkie z dostępnych wyników eksperymentów.
3. Wykorzystując wielkości parametrów znalezione w punkcie 2 jako wyjściowe dla modelu stochastycznego znajdź ich najlepsze dostrojenie w sensie jakościowego oddania wyników wszystkich dostępnych eksperymentów.

W zaproponowanych modelach występują sprzężenia zwrotne, a modele dopasowywano do kilku eksperymentów równocześnie, więc kroki 2 i 3 posiadają charakter iteracyjny. Zaprezentowane podejście pomimo, że czasochłonne pozwala na uzyskanie bardziej uniwersalnych modeli w rozumieniu ich zdolności do generalizacji.

Rozdział 4

Istniejące modele ścieżki sygnałowej NF- κ B

4.1 Streszczenie

Czynnik transkrypcyjny NF- κ B reguluje wczesną odpowiedź immunologiczną przez przekazanie informacji o pobudzeniu patogenami czy cyklinami do jądra komórkowego powodując odpowiedź w postaci zmian ekspresji odpowiednich genów.

Rozdział czwarty poświęcony jest istniejącym w literaturze modelom ścieżki sygnałowej NF- κ B ze szczególnym uwzględnieniem modelu zaproponowanego przez Tomasza Lipniackiego i współpracowników. w roku 2007 [56]. Model ten, rozwijany od 2004 roku, w odróżnieniu od reszty modeli, jest rozwiązaniem stochastycznym umożliwiającym symulacje zachowania się pojedynczych komórek. Zawiera on dwie pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego. Pierwsza z nich wiąże czynnik transkrypcyjny z jego inhibitorem I κ B α i w przypadku zaistnienia wymuszenia powoduje powstawanie w układzie oscylacji. Druga pętla ujemnego sprzężenia zwrotnego prowadząca przez A20 jest nowym rozwiązaniem wprowadzonym przez autorów. Działanie tej pętli polega na utrwalaniu oscylacji produkowanych przez pętlę pierwszą. Jak pokazuje eksperyment Lee i in. [51] brak drugiego sprzężenia zwrotnego prowadzi do zaniku oscylacji w module NF- κ B. Rozwiązania powstałe przed modelem [56], na przykład proponowane grupę Hoffmanna i Levchenki [34], nie posiadały sprzężenia poprzez A20 i skupiały się na interakcji trzech form białka I κ B. Powyższa cecha jak i brak dbałości o zdolność do generalizacji, sprawiają, iż modele te nie są w stanie w sposób prawidłowy oddać zachowania się komórki przy różnych protokołach wymuszenia i blokady A20.

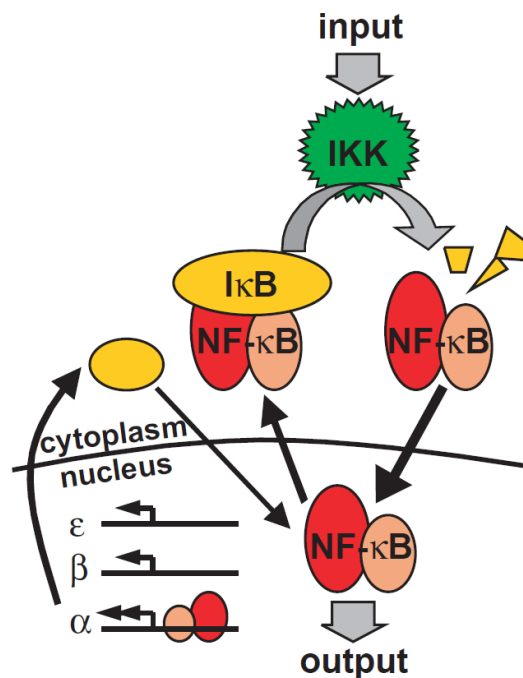
Opracowany przez Lipniackiego i in. [56] model stał się podstawą do budowy modelu łącznego ścieżek NF- κ B i p53 przedstawionego w rozdziale siódmym.

Modele Lipniackiego i in. oraz zespołu Hoffmanna-Levchenki stanowią dwie główne grupy modeli modułu NF- κ B spotykane w literaturze i one zostaną omówione w rozdziale czwartym. Drugi podrozdział zawiera opis modeli opracowanych przez grupę Hoffmanna-Levchenki, podrozdział trzeci opis dwóch wersji modeli Lipniackiego i in. z roku 2004 i 2006. W czwartej części rozdziału czwartego omówiłem szczegółowo budowę modelu Lipniackiego i in. z roku 2007, w podrozdziale piątym przedstawiono rezultaty jego symulacji.

4.2 Modele grupy Hoffmana

Modele ścieżki sygnałowej NF- κ B proponowane przez grupę Hoffmanna-Levchenki, do której należą między innymi Cheong, Kearns i Werner są modelami deterministycznymi.

Model Hoffmanna-Levchenki zaproponowany został po raz pierwszy w roku 2002 [34] w celu wyjaśnienia obserwowanych w eksperymentach oscylacji w poziomach NF- κ B występujących po pobudzeniu jego ścieżki sygnałowej. Zawierał on białko IKK, czynnik transkrypcyjny NF- κ B (rysunek 4.1) oraz trzy formy białka I κ B (α , β , ϵ) będące inhibitorem NF- κ B.



Rysunek 4.1: Model ścieżki sygnałowej NF- κ B grupy Hoffmanna-Levchenki z roku 2002 [34]. Występują w nim 3 formy I κ B, brak sprzężenia od A20. Wymuszenie podawane jest za pomocą profilu IKK.

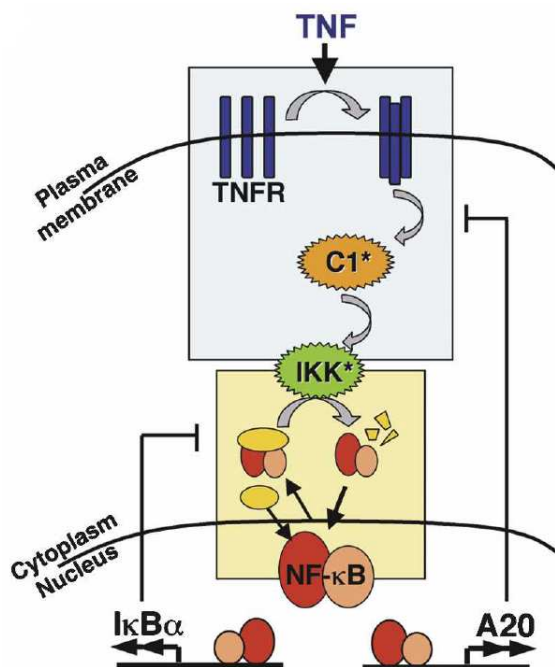
Przy braku pobudzenia NF- κ B znajduje się w cytoplazmie uwięzione w kompleksie z I κ B. W wyniku pobudzenia na przykład przez TNF α w komórce pojawia się aktywne białko IKK. W modelu [34] pominięto część ścieżki znajdująca się pomiędzy receptorami wychytującymi TNF α , a białkiem IKK przyjmując pojawienie się aktywnego IKK jako wejście do układu. Aktywne białko IKK fosforyluje cząsteczki I κ B zarówno swobodne jak i te w kompleksie z NF- κ B, co prowadzi do ich rozpadu. Uwolnione w ten sposób białko NF- κ B przedostaje się do jądra, gdzie pełni rolę czynnika transkrypcyjnego dla wszystkich trzech form swego inhibitora. Po procesie transkrypcji I κ B mRNA ulega translacji w cytoplazmie i wraca do jądra komórkowego gdzie przyczepia się do NF- κ B wypychając je do cytoplazmy. Sprzężenie pomiędzy NF- κ B, a wszystkimi trzema formami I κ B pełni w układzie rolę ujemnego sprzężenia zwrotnego, co razem z opóźnieniem wynikającym z transkrypcji i translacji I κ B prowadzi do pojawienia się oscylacji w przypadku ciągłego wymuszenia.

Powyższy model stał się podstawą dla pojawiających się w literaturze kolejnych modeli ścieżki sygnałowej NF- κ B. Wszystkie one zawierają w sobie element oscylacyjny oparty o

sprzężenie NF- κ B z I κ B.

W ciągu paru następných lat współpracownicy Hoffmana i Levchenki przeprowadzili szereg eksperymentów starając się dokładniej wyjaśnić rolę i współdziałanie trzech izoform I κ B [100], [43], [12]. Do analizy swych eksperymentów używali oni bazowego modelu z roku 2002 modyfikując go, a w szczególności jego parametry tak by oddawał on jak najlepiej uzyskane przez nich rezultaty. Niestety przy dopasowywaniu modelu do kolejnego eksperymentu nie zwracano uwagi na doświadczenia poprzednie, w efekcie grupa nie wypracowała spójnego modelu oddającego zachowanie się ścieżki NF- κ B przy różnych protokołach wymuszenia. Powstało za to kilka modeli dopasowanych do indywidualnych eksperymentów.

W roku 2008 grupa Hoffmanna-Levchenki badając rolę ujemnych sprzężeń w module regulatorowym NF- κ B rozszerzyła swój model o sprzężenie zwrotne pochodzące od białka A20 [101].



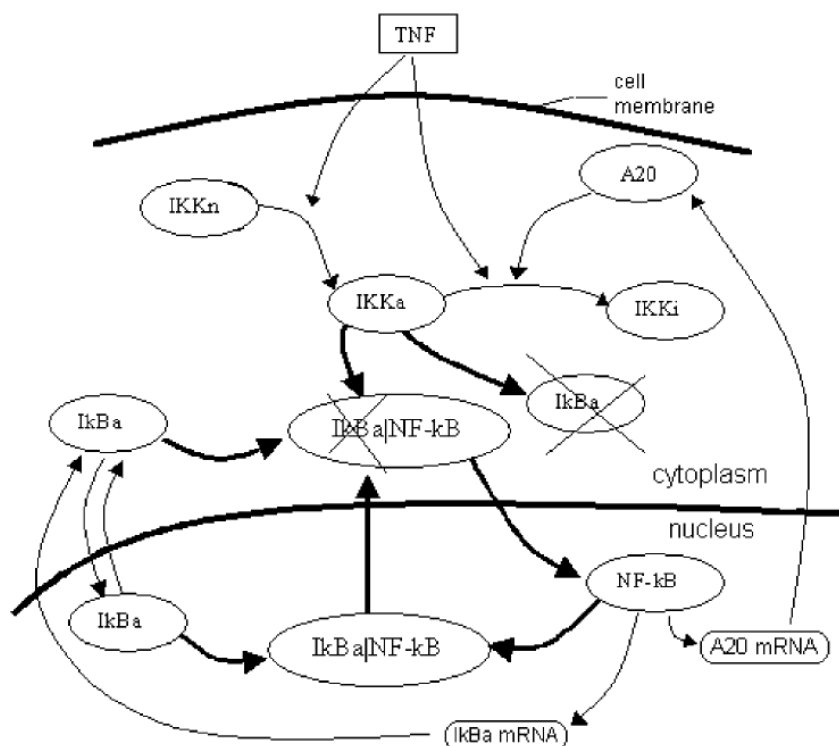
Rysunek 4.2: Najnowsza wersja modelu ścieżki sygnałowej NF- κ B grupy Hoffmanna-Levchenki z roku 2008 [101]. Występuje tu jedna forma I κ B, ujemne sprzężenie zwrotne biegnące przez A20 oraz wymuszenie poprzez receptory wychytujące TNF α . Powyższe zmiany w stosunku do modelu pierwotnego (rysunek 4.1) spowodowały, iż stał się on tożsamy z deterministycznym przybliżeniem modelu [56].

W swej najnowszej wersji (rysunek 4.2) wymuszeniem w modelu jest pojawienie się TNF α , który aktywuje receptory aktywujące z kolei białko pośrednie, które następnie fosforyluje IKK. Zrezygnowano z trzech form I κ B zostawiając I κ B α . Po tych zmianach model stał się tożsamy w strukturze z modelem [56], dlatego też nie został omówiony oddzielnie. Modele opracowane przez grupę Hoffmanna-Levchenki ze względu na swój deterministyczny charakter są w stanie prawidłowo oddać wyniki eksperymentu populacyjnego, nie nadają się jednak do symulacji zachowania się pojedynczych komórek, ponadto z powodów wymienionych powyżej nie nadają się do symulacji odpowiedzi komórki na szerokie

spektrum protokołów wymuszenia.

4.3 Modele Lipniackiego i współpracowników

Odmierna filozofia w dopasowaniu modeli do danych eksperymentalnych widoczna jest w pracach Lipniackiego i współpracowników. Założono w nich jak najlepsze dopasowanie modelu, nie do konkretnego eksperymentu, ale jednocześnie do wielu eksperymentów występujących w literaturze. Pojawienie się nowych danych eksperymentalnych prowadziło do powstania kolejnej wersji modelu, którego zadaniem było oddanie charakteru obecnego jak i poprzednich eksperymentów. Uzyskany w ten sposób w 2007 roku model [56] może służyć do symulacji zachowania się ścieżki sygnałowej NF- κ B przy różnych protokołach wymuszenia z aktywną i nieaktywną pętlą sprzężenia poprzez inhibitor A20. Najnowszy model opisany szczegółowo poniżej jak i użyty do budowy modelu łącznego systemów NF- κ B i p53 w rozdziale siódmym jest rozwinięciem poprzednich modeli Lipniackiego i in., więc zostaną one omówione tutaj jedynie w skrótej formie. Pełniejsze przedstawienie zastosowanych założeń i uproszczeń znajduje się w opisie aktualnej wersji modelu z roku 2007.

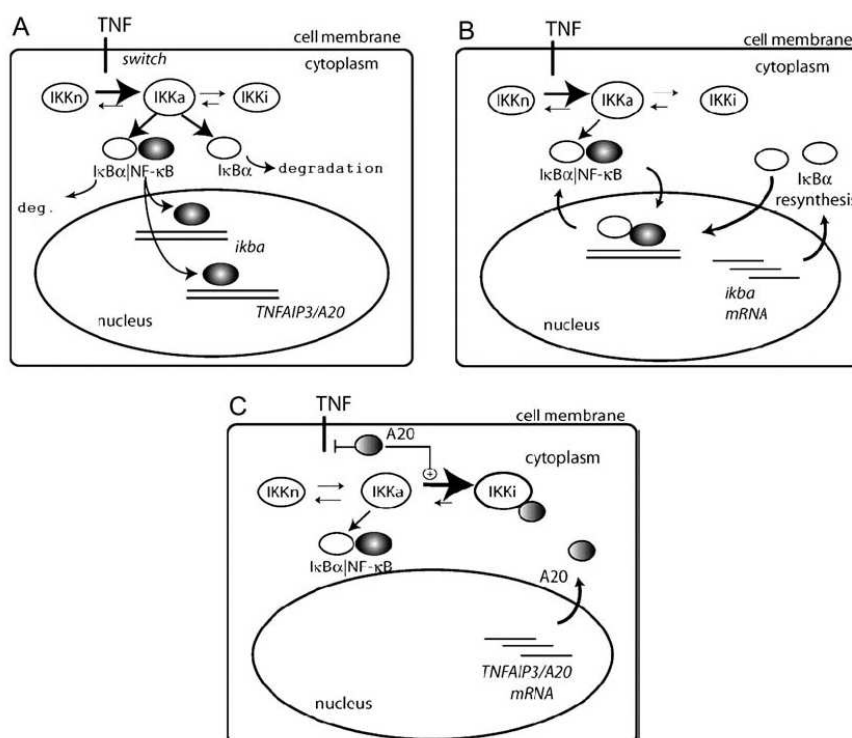


Rysunek 4.3: Model Lipniackiego i in. z roku 2004 [54]. Widoczne dwa ujemne sprzężenia zwrotne: poprzez $I\kappa B\alpha$ oraz A20. wymuszeniem jest pojawienie się sygnału TNF α . Model ten był modelem deterministycznym

Pierwszym modelem opracowanym przez Lipniackiego ze współpracownikami był model z roku 2004 pokazany na rysunku 4.3, zaprezentowany w [54]. Został on stworzony w celu wyjaśnienia obserwowanych w eksperymencie Lee i in. [51] różnic w zachowaniu się

komórek normalnych i komórek pozbawionych genu A20. Był to model deterministyczny oparty o jedną postać białka $I\kappa B$ ($I\kappa B\alpha$). Wymuszeniem w modelu było pojawienie się $TNF\alpha$. Pominęto receptory oraz białko pośrednie IKKK zakładając, że pojawienie się wymuszenia powoduje aktywację białka IKK (IKKn) z jednej strony i jego powolną dezaktywację do nowej formy (IKKi) z drugiej strony. Aktywne IKK (IKKa) degradując $I\kappa B\alpha$ uwalnia $NF-\kappa B$ pozwalając na jego import do jądra komórkowego i odegranie roli czynnika transkrypcyjnego dla $I\kappa B\alpha$ i A20. Nowo zsyntetyzowane $I\kappa B\alpha$ wraca do jądra wyciągając $NF-\kappa B$ do cytoplazmy i tym samym przerywając transkrypcję. A20 po transkrypcji i translacji powoduje przyspieszenie dezaktywacji IKK do formy nieaktywnej IKKi różnej od IKKn, z której nie może ono być powtórnie aktywowane. Mamy więc do czynienia z dwoma pętlami ujemnego sprzężenia zwrotnego. Model dobrze oddawał eksperyment Lee i in. [51] przeprowadzony na myszach pozbawionych genu A20 jak również eksperyment [34].

Kolejny model Lipniacki ze współpracownikami stworzyli w roku 2006 [55] (rysunek 4.4) w celu wyjaśnienia zaobserwowanej przez Nelsona [68] desynchronizacji pojedynczych komórek w odpowiedzi na wymuszenie. Oddanie wyników Nelsona stało się możliwe dzięki



Rysunek 4.4: Model Lipniackiego i in. z roku 2006 [55]. W stosunku do wersji z roku 2004 zmieniony został sposób oddziaływania $TNF\alpha$ jak i A20 na układ. W modelu uwzględniono stochastyczną aktywację i dezaktywację genów $I\kappa B\alpha$ i A20. Model z roku 2006 jest modelem stochastycznym oddającym zachowanie pojedynczych komórek. A. Aktywacja modułu $NF-\kappa B$. B. Pętla autoregulacji $NF-\kappa B$ i $I\kappa B\alpha$. C. Pętla autoregulacji $NF-\kappa B$ i A20

uwzględnieniu w modelu stochastyczności związanej z aktywacją genów A20 i $I\kappa B\alpha$, dzięki czemu produkcja odpowiadającego im mRNA nie jest ciągła. Poziom czynnika transkryp-

cyjnego w jądrze nie odpowiada bezpośrednio za tempo transkrypcji, lecz określa prawdopodobieństwo aktywacji genów, podobnie poziom inhibitora I κ B α odpowiedzialnego za dezaktywację jądrowego NF- κ B i jego przemieszczanie się do cytoplazmy, odpowiada w tym modelu za prawdopodobieństwo dezaktywacji genów, a nie bezpośrednio za obniżanie tempa transkrypcji. W modelu założono, iż w momencie aktywacji genu uruchomiona zostaje produkcja odpowiadającego mu mRNA. Produkcja ta zachodzi z maksymalną możliwą wydajnością do czasu aż gen ulegnie dezaktywacji. W rezultacie produkcja mRNA odbywa się w transzach tym większych im dłuższy jest czas aktywności genu. Poziomy NF- κ B jak i I κ B α odpowiadają jedynie za prawdopodobieństwa aktywacji i dezaktywacji genów, więc ze względu na stochastyczny charakter tego procesu pomimo zastosowania tego samego protokołu wymuszenia w kolejnych realizacjach algorytmu pojawiają się różnice utożsamiane w modelu z różnicami pomiędzy odpowiedziami różnych komórek. Przyjęcie takiej interpretacji umożliwi stwierdzenie, iż model jest w stanie oddawać zachowanie się pojedynczych komórek w odpowiedzi na bodziec. Dodatkowo w modelu zmieniono sposób oddziaływania TNF α , które jedynie aktywuje kinazę IKK n do postaci IKK a nie dezaktywując jej jak to było w modelu poprzednim.

Ostatnią wersją stworzoną przez Lipniackiego ze współpracownikami jest model z roku 2007 zaprezentowany w [56]. Powstał on w celu przebadania potencjalnych możliwości zróżnicowania reakcji komórek na pojawienie się małej dozy TNF α . Uwzględniono w nim stochastyczną aktywację receptorów TNFR1 oraz kinazę pośredniczącą w przekazaniu sygnału do IKK zwaną IKKK. Przemodelowano również zachowanie się IKK, które obecnie ulega aktywacji dzięki działaniu IKKK a przechodząc z formy IKK n do IKK a , która może być dezaktywowana do formy IKK i przy czym dezaktywacja ta jest przyspieszana w obecności białka A20. Białko IKK i wraca do postaci nieaktywnej IKK n poprzez pośrednią formę IKK ii . Najnowsza wersja modelu została wykorzystana do budowy modelu łącznego przedstawionego w rozdziale siódmym i dlatego zostanie omówiona szerzej.

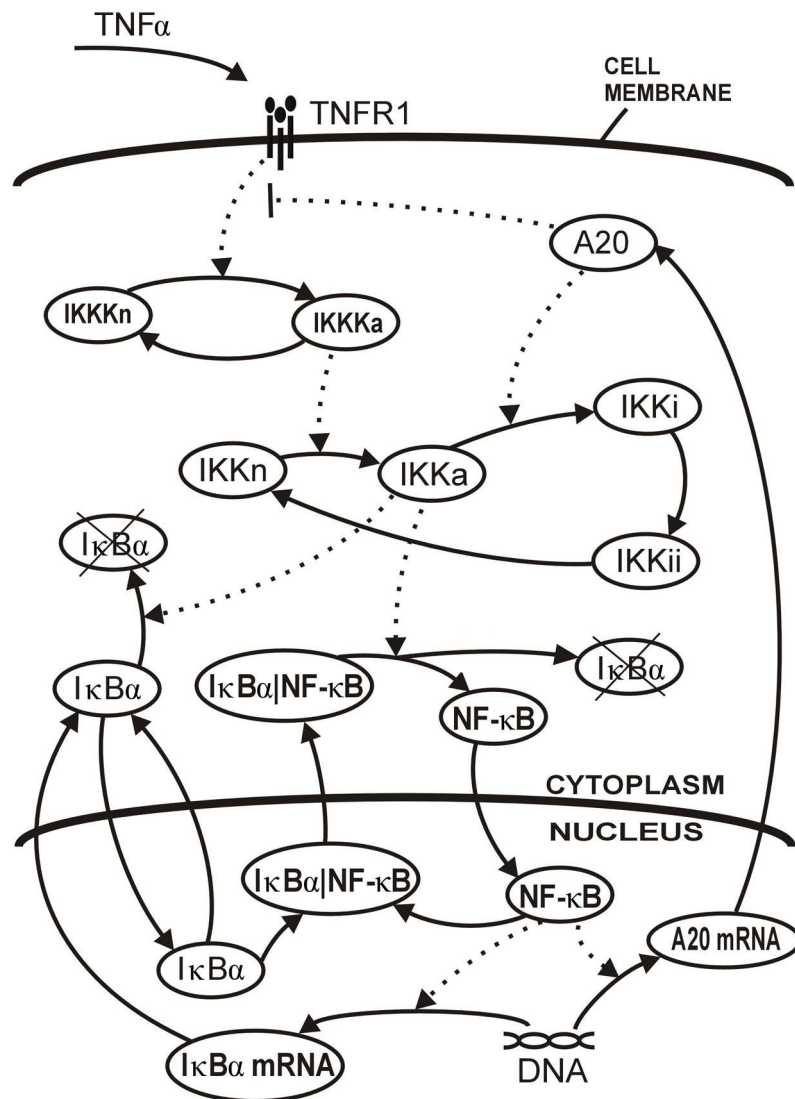
4.4 Struktura modelu Lipniackiego i współpracowników z roku (2007)

Stworzony przez Lipniackiego i in. model ścieżki sygnałowej NF- κ B zakłada dwu kompartmentalną kinetykę NF- κ B oraz jego inhibitorów I κ B α i A20. Model ten (rysunek 4.5) będący modelem stochastycznym pozwala na analizę odpowiedzi pojedynczych komórek, zarówno normalnych jak i z zablokowanym białkiem A20, na wymuszenie różnymi protokołami podawania TNF α . Model zawiera dwie pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego. Pierwszą wiążącą NF- κ B z jego inhibitorem I κ B α oraz drugą prowadzącą przez A20, IKKK, IKK i I κ B α . Dokładne działanie modelu oraz podstawy biologiczne, na których oparto się przy jego budowie przedstawione są poniżej.

Aktywacja receptorów

Aktywacja ścieżki sygnałowej NF- κ B rozpoczyna się od aktywacji receptorów. Pojedynczy trymer TNF α dołączając się do receptora TNFR1 powoduje jego trymeryzację i po przyłączeniu cząsteczek takich jak RIP i TRAF2 powstanie aktywnego kompleksu receptora zdolnego do aktywacji IKKK. Dezaktywacja receptora następuje w sposób spontaniczny. Grell i in. w [28] pokazują, że tryмеры TNF α dysocjują z receptorów TNFR1 z półokresem równym 33 minutom, podczas gdy czas ich internalizacji wynosi około 10-20 minut.

Bazując na powyższym założono, iż liczba receptorów oznacza liczbę trymerów receptora.



Rysunek 4.5: Model Lipniackiego in. z roku 2007 [56]. W modelu pojawia się dodatkowa stochastyczność związana z aktywacją i dezaktywacją receptorów. Występują w nim dwie pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego. Wymuszenie związane jest z obecnością TNFα w otoczeniu komórki.

Receptory aktywują się i dezaktywują niezależnie od siebie z prawdopodobieństwem aktywacji $r_r^b(t)$ proporcjonalnym do koncentracji TNFα(t) (która może być zależna od czasu) i prawdopodobieństwem dezaktywacji r_r^d , które jest stałe

$$r_r^b(t) = k_b TNF(t), \quad r_r^d = k_f. \quad (4.1)$$

Transkrypcja i translacja

Wiele eksperymentów wskazuje na to, że proces transkrypcji RNA jest dyskretny, zaś czynniki transkrypcyjne regulują prawdopodobieństwo tego, że dany gen jest aktywny bądź nieaktywny, a nie tempo samej transkrypcji [95], [19], [78]. Przełączanie genu z stanu aktywnego w nieaktywny i odwrotnie wprowadza dużą stochastyczność w ekspresji genów komórek eukariotycznych jak i w całej regulacji komórkowej [46], [44], [55], [71], przegląd w [40]. Jeżeli czas aktywności genu jest dostatecznie długi, to skutkuje to znaczącym wzrostem ilości zsyntetyzowanego mRNA, co z kolei przekłada się na jeszcze większy wzrost ilości odpowiedniego białka.

W modelu założono, że geny A20 i $I\kappa B\alpha$ posiadają dwie jednakowe kopie aktywowane niezależnie, przez przyłączenie się NF- κ B do obszaru promotora i dezaktywowane przez $I\kappa B\alpha$, które przyłączając się do NF- κ B powoduje jego oderwanie z obszaru promotora. Pomimo, że nie ma dowodów, iż współczynniki aktywacji i dezaktywacji genów są takie same dla $I\kappa B\alpha$ i dla A20, to dla zmniejszenia liczby parametrów w modelu przyjęto że są one równe. Stan każdej kopii genu G^i ($i = 1, 2$) wynosi $G^i = 1$ gdy NF- κ B jest przyłączone do obszaru promotora, i $G^i = 0$ w przeciwnym wypadku. W związku z tym stan zależnych od NF- κ B genów $G = G^1 + G^2$ może być równy 0, 1 lub 2. Prawdopodobieństwa przyłączenia i dysocjacji są jednakowe dla każdej kopii i wynoszą odpowiednio $r^b(t)$ i $r^d(t)$, gdzie:

$$r^b(t) = q_{1n} NF\kappa B_n(t), \quad r^d(t) = q_{2n} I\kappa B\alpha_n(t). \quad (4.2)$$

Założono, że gdy gen jest w stanie aktywnym, to transkrypcja następuje z tempem c_{1n} . Prędkość polimerazy mRNA ~ 40 nt/s i charakterystyczna minimalna odległość pomiędzy sąsiednimi polimerazami 250 nt dają górny limit wydajności transkrypcyjnej pojedynczej kopii genu $c_{\max} = 40/250 = 0.16$ [mRNA/s]. Podobnie górny limit wydajności translacji $t_{\max} = 0.5$ [protein/mRNA/s] [53].

Ujemne sprzężenie zwrotne poprzez $I\kappa B\alpha$

W komórkach, które nie uległy pobudzeniu NF- κ B jest uwięzione w cytoplazmie w kompleksie z $I\kappa B$. Istnieje kilka izoform $I\kappa B$, z których najważniejsza jest $I\kappa B\alpha$. Pobudzenie komórki sygnałem zewnętrznym, w szczególności TNF α czy IL-1, prowadzi do aktywacji kinazy IKKK aktywującej z kolei białko IKK. Aktywne IKK fosforyluje $I\kappa B\alpha$ w serynie 32 i 36 prowadząc do jego ubikwitynacji w lizynie 21 i 22, a następnie do jego szybkiej degradacji przez proteasom 26S [41]. Yang i in. w [104] oceniają, że w komórce znajduje się około 135000 cząsteczek $I\kappa B\alpha$, z których większość jest degradowana w pierwszych 10 minutach po stymulacji komórki dużą dawką TNF α . Uwolnione w ten sposób NF- κ B przenika do jądra komórkowego gdzie jego wysoka koncentracja prowadzi do aktywacji genu $I\kappa B\alpha$. Wyprodukowane mRNA przedostaje się do cytoplazmy gdzie ulega translacji tworząc białka. Nowo zsyntetyzowane $I\kappa B\alpha$ przenika do jądra komórkowego gdzie pod nieobecność IKK odrywa NF- κ B od obszaru promotora tworząc z nim kompleksy, które następnie są transportowane do cytoplazmy [87]. Według badań grupy Hoffmana-Levchenki [34] po stymulacji komórki przez TNF α poziom $I\kappa B\alpha$ powraca do stanu wyjściowego po 30-75 minutach. Zmniejszenie się liczby aktywnych cząsteczek NF- κ B w jądrze powoduje zmniejszenie się prawdopodobieństwa aktywacji odpowiednich genów, a tym samym

zmniejszenie liczby wyprodukowanego mRNA i odpowiadających mu białek, w tym A20. Zmniejszenie się liczby A20 prowadzi do ponownej aktywacji IKK (opis poniżej), a w następstwie degradacji $I\kappa B\alpha$ i uwolnienia NF- κB , co rozpoczyna kolejny cykl oscylacji.

Ujemne sprzężenie zwrotne A20

Drugim ujemnym sprzężeniem zwrotnym występującym w ścieżce sygnałowej NF- κB jest sprzężenie prowadzące przez białka IKKK, IKK, $I\kappa B\alpha$, NF- κB i A20.

W niepobudzonych komórkach nie występuje ekspresja A20. Aktywowany receptor aktywuje białko IKKK, które z kolei fosforyluje IKK. Z biologicznego punktu widzenia istnieją co najmniej dwie kinazy biorące udział w tym procesie: MEKK3 [69],[6] i TAK1 [6],[89], [82]. Shim i in. [82] pokazują, iż TAK1 pośredniczy w aktywacji IKK przy wymuszeniu za pomocą TNF α i IL-1. Homozygotyczne, zmutowane komórki nie wykazują aktywności NF- κB po stymulacji TNF α i wykazują mniejszą aktywność NF- κB niż komórki niezmutowane przy wymuszeniu IL-1. Nho i O'Dwyer [69] wykazali, że wyciszenie MEKK3 zmniejsza aktywność IKK. Powyższe spostrzeżenia uzupełnione o wiedzę pochodzącą z eksperymentu [6] sugerują, iż TAK1 przyłącza się do kompleksu aktywnego receptora TNFR1 przy udziale RIP i współpracując z białkiem MEKK3 aktywuje IKK. W modelu uproszczono tą część wprowadzając jedno białko pośrednie IKKK i założono, iż jest ono aktywowane przez aktywny receptor (przechodzi ono z formy IKKKn do IKKKa). Przy braku aktywacji IKKK spontanicznie wraca do swej formy nieaktywnej IKKKn. Dodatkowo założono stałą liczbę cząsteczek IKKK w komórce (na przykład ich degradacja jest równoważona przez produkcję.)

Aktywne IKK degraduje $I\kappa B\alpha$ uwalniając NF- κB , które przedostaje się do jądra komórkowego aktywując gen A20 [48]. A20 jest ligazą ubikwitynującą, której dokładne działanie nie jest jeszcze znane. W modelu założono, iż oddziałuje ono na badaną ścieżkę na dwa sposoby: (1) zgodnie z [102] inicjuje ono degradację RIP, który jest niezbędnym elementem aktywnego kompleksu receptora TNFR1, tym samym go wyłączając, oraz (2) łączy się bezpośrednio z IKK γ zmieniając aktywne IKK w nieaktywną formę IKKi, która nie ma zdolności do ponownej aktywacji [105]. Dokładny mechanizm dezaktywacji IKK pozostaje nadal sprawą niewyjaśnioną. Wiadomym jest, iż nieaktywna forma IKKi przechodzi w formę podstawową IKKn poprzez szereg form pośrednich, które różnią się od siebie zajętością miejsc regulatorowych na IKK β . Miejsc tych jest 16, więc może istnieć wiele stanów pośrednich [81]. Aby oddać występujące tu opóźnienie w modelu założono istnienie stanu pośredniego między IKKi i IKKn zwanego IKKii.

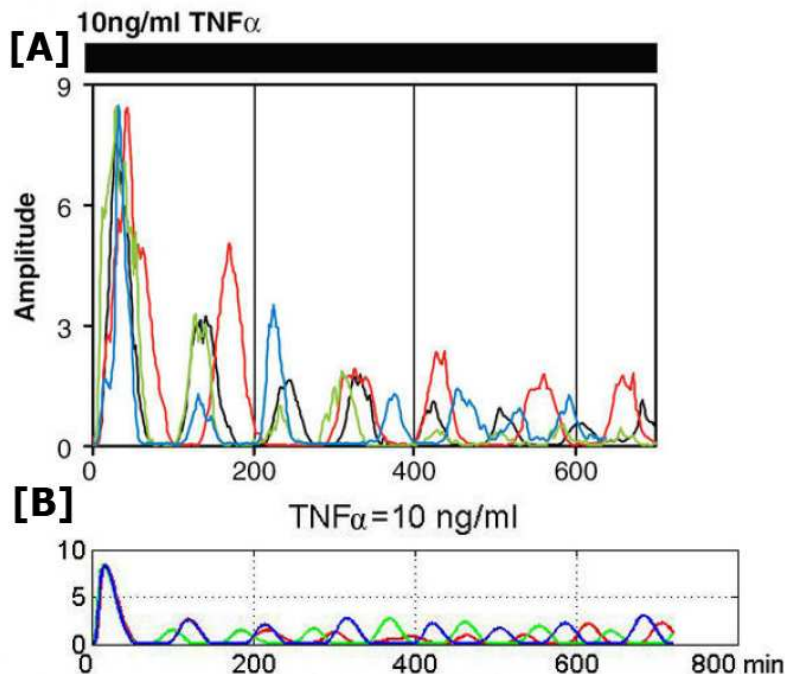
Brak aktywnego IKK powoduje brak degradacji wolnego $I\kappa B\alpha$ jak i $I\kappa B\alpha$ w kompleksie z NF- κB . W efekcie NF- κB zostaje wyciągnięte z jądra komórkowego, co powoduje zaprzestanie produkcji mRNA. W komórkach pozbawionych A20 ciągle aktywne IKK poprzez szybką degradację nowo zsyntetyzowanego $I\kappa B\alpha$ zaburza działanie pierwszej pętli ujemnego sprzężenia [54]. W komórkach pozbawionych genu A20 (A20 $-/-$) po stymulacji TNF α zaobserwować można iż poziom jądrowego NF- κB nie oscyluje, lecz ustala się w stanie wysokim (rysunek 4.7). Ilustracją powyższego jest eksperyment, w którym można zauważyć, iż myszy pozbawione genetycznie białka A20 wykazują nadwrażliwość na TNF α , nawet gdy produkcja $I\kappa B\alpha$ mRNA jest w nich nie zaburzona [51]. Rolą drugiej pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego (działającej poprzez A20) jest zatem stabilizacja działania pętli pierwszej (działającej poprzez $I\kappa B\alpha$).

4.5 Rezultaty modelu Lipniackiego i współpracowników

Jak wspomniano [56] jest modelem stochastycznym. W modelach stochastycznych poziomy molekuł regulacyjnych jak na przykład czynników transkrypcyjnych nie określają tempa produkcji mRNA, a jedynie prawdopodobieństwa wyprodukowania porcji mRNA poprzez zaktywowanie genu. Dzięki temu pomimo zastosowania tego samego wymuszenia oraz rozpoczęcia symulacji z tych samych warunków początkowych w każdej realizacji możemy uzyskać inne rozwiązanie jakościowe i ilościowe. Przykładowo komórki mogą przeżyć bądź ulec apoptozie lub poziomy końcowe białek, w komórkach które przeżyły, mogą być różne. Różnice w realizacji kolejnych powtórzeń algorytmu numerycznego można traktować jako odpowiedzi różnych komórek należących do tej samej populacji. W celu zaprezentowania poprawności działania modelu [56] w niniejszej rozprawie omówiono jego zgodność z doświadczeniami Nelsona i in. [68] i Lee i in [51]. Zachowanie się modelu w odpowiedzi na inne protokoły wymuszeń znane z literatury opisane jest dokładnie w [56]. Ponadto poniżej pokazano wyniki symulacji przy ciągłym wymuszeniu dużą i małą dawką TNF α jak i wymuszeniu czterogodzinnym pulsem TNF α , który to protokół wymuszenia znalazł zastosowanie przy symulacji modelu łącznego.

Doświadczenie Nelsona i in. 2004

W roku 2004 Nelson i in. [68] zaprezentowali doświadczenie przedstawione na rysunku 4.6a. Widzimy na nim w jaki sposób zmieniają się w czasie poziomy NF- κ B dla czterech przykładowych komórek (oznaczonych różnymi kolorami), które zostały poddane wymu-

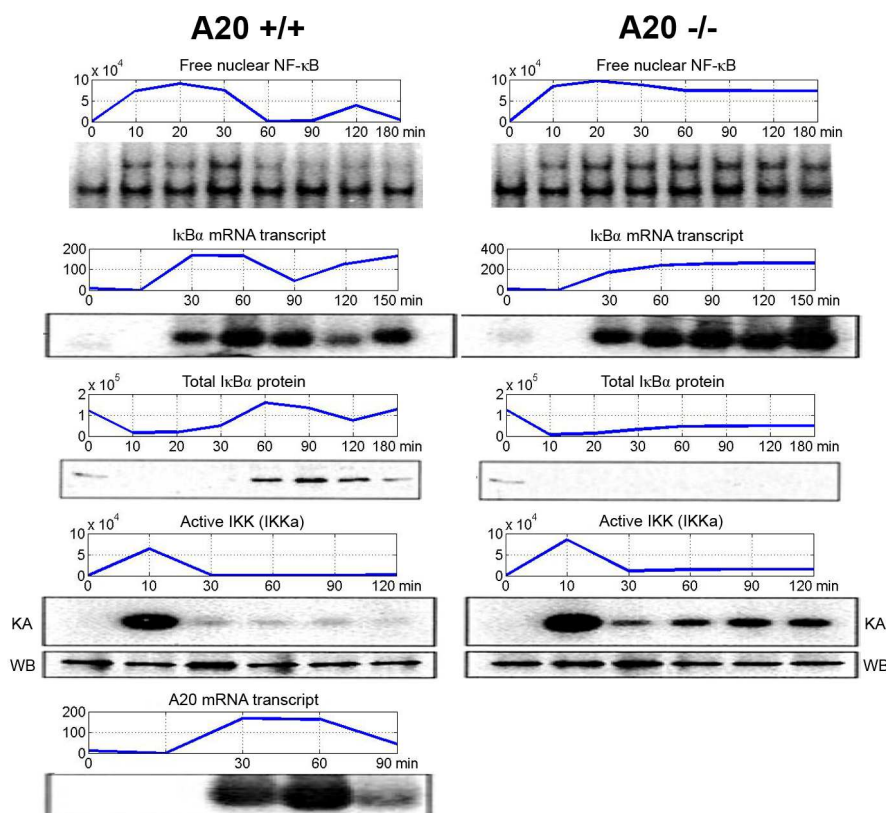


Rysunek 4.6: Doświadczenie Nelsona i in. z roku 2004 [68]. Panel A. Odpowiedzi czterech przykładowych komórek (rozróżnionych kolorami) na wymuszenie ciągłe dawką 10 ng/ml TNF α . Panel B. Przewidywania modelu. Widać wyraźnie zsynchronizowany pierwszy pik odpowiedzi i późniejszą desynchronizację komórek.

szeniu 10ng/ml $TNF\alpha$. Pierwszy pik odpowiedzi jest dobrze zsynchronizowany między komórkami oraz jest zdecydowanie najmocniejszy. Wynika to z faktu, iż przy tak silnym wymuszeniu wszystkie prezentowane komórki zostają natychmiast zaktywowane przy czym poziom aktywacji IKKK jest wysoki i efekty stochastyczne są mniej widoczne. Przy kolejnych pikach aktywacja IKKK jest słabsza, a więc efekty stochastyczne się uwypuklają i komórki się desynchronizują. Dokładny mechanizm powstawania tych oscylacji oraz powodów desynchronizacji omówiony został w części poświęconej zachowaniu modelu w odpowiedzi na wymuszenie ciągle. Na rysunku 4.6b zaprezentowano przewidywania modelu [56] w odpowiedzi na takie samo wymuszenie jak w doświadczeniu [68]. Wyraźnie widać synchronizację komórek (oznaczonych różnymi kolorami) w pierwszym pik odpowiedzi, który jest również najsilniejszy oraz dalsze osłabienie się odpowiedzi i postępującą desynchronizację między komórkami. Jak wspomniano wcześniej założeniem Lipniackiego i jego współpracowników nie było idealne dopasowanie modelu do konkretnego eksperymentu, niemniej jednak można stwierdzić, iż jego zachowanie jest zgodne z wynikami [68].

Doświadczenie Lee i in. z roku 2000

Dzięki uwzględnieniu dodatkowego sprzężenia zwrotnego od A20 model [56] jest w sta-



Rysunek 4.7: Eksperyment Lee i in. z roku 2000 [51] oraz przewidywania modelu. Wyniki eksperymentu przedstawione są w formie blotów, rezultaty uzyskane z modelu w formie plotów nad nimi. Kolumna lewa przedstawia zachowanie się komórek niezmodyfikowanych podczas gdy prawa komórek pozbawionych genu A20.

nie prawidłowo oddać eksperyment Lee i in. z roku 2000, opublikowany w [51] i pokazany na rysunku 4.7. Lee i in. [51] korzystają z dwóch linii komórkowych mysich fibroblastów zarodkowych, z których jedna była niemodyfikowana (tak zwana "wild type"), zaś druga zmodyfikowana genetycznie nie posiadała genu kodującego A20 (A20 -/-). Obie linie komórkowe zostały poddane wymuszeniu TNF α , a następnie zmierzono w nich poziomy jądrowego NF- κ B, transkryptu I κ B α , całkowitej ilości białka I κ B α , aktywnego IKK oraz w przypadku komórek wild type transkryptu A20.

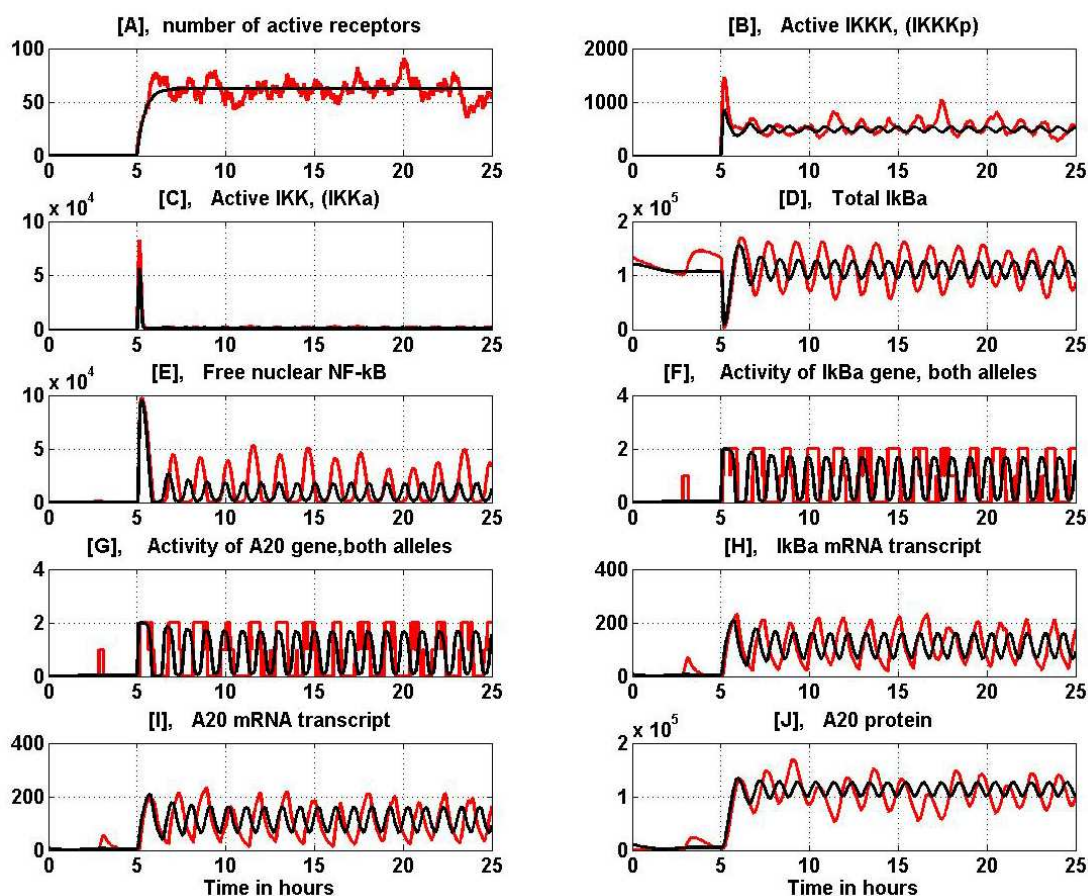
Na rysunku 4.7 pokazano wyniki eksperymentu [51] w formie blotów oraz przewidywania modelu [56] w postaci plotów nad nimi. W przypadku komórek niemodyfikowanych (lewa kolumna) po wymuszeniu wzrasta poziom aktywnego białka IKK, które degradowuje I κ B α i uwalnia NF- κ B pozwalając na jego transport do jądra, co powoduje iż po około 20 minutach od wymuszenia jego poziom w jądrze osiąga maksimum. W efekcie następuje aktywacja genów i produkcja transkryptów I κ B α oraz A20. Poziom białka I κ B α rośnie, co powoduje ponowne związanie NF- κ B z I κ B α i jego transport do cytoplazmy. Jednocześnie białko A20 blokuje aktywację IKKK oraz dezaktywuje IKK. Brak aktywnego NF- κ B w jądrze powoduje spadek ilości transkryptów, a następnie odpowiadających im białek, co prowadzi do kolejnej oscylacji.

W komórkach pozbawionych genu A20 mamy do czynienia z inną dynamiką (prawa kolumna). Jego brak sprawia, że przy ciągłym podawaniu TNF α receptory pozostają w stanie aktywnym, aktywując IKKK, które z kolei aktywuje IKK powodując, iż jego poziom jest wyższy niż w komórkach z nieuszkodzonym genem A20. Wyższy poziom aktywnego IKK powoduje, iż pomimo włączonej transkrypcji poziom I κ B α nie jest w stanie podnieść się do poziomu wyjściowego gdyż białko to jest bezustannie degradowane. Tym samym w jądrze komórkowym stale obecne jest wolne NF- κ B włączające produkcję transkryptu I κ B α i wielu innych genów. Jak widać na rysunku 4.7 model [56] w sposób prawidłowy oddaje obserwowane w eksperymencie zachowanie się komórek.

Zachowanie się modelu przy wymuszeniu ciągłym

Na rysunku 4.8 pokazano przebieg poziomów głównych zmiennych modelu [56] w odpowiedzi na wymuszenie ciągle dawką 10 ng/ml TNF α . Kolorem czerwonym przedstawiono zachowanie się przykładowej komórki w opisie stochastycznym, kolorem czarnym odpowiedź modelu w przybliżeniu deterministycznym. Wymuszenie ciągle wspomnianą dawką zastosowane zostało między innymi w eksperymencie [68], w którym widoczna była desynchronizacja komórek oraz słabszy poziom kolejnych pików odpowiedzi po pierwszym silnym pikie.

Przed pojawieniem się wymuszenia ($0h < t < 5h$) układ w przybliżeniu deterministycznym znajduje się w stanie ustalonym. Receptory są nieaktywne, brak jest aktywnego IKKK, IKK, większość NF- κ B znajduje się w cytoplazmie uwięzione w kompleksie z I κ B α , w związku z czym geny zależne od niego transkrypcyjnie są nieaktywne. Poziom białka A20 jest bliski zeru. Po stymulacji komórki TNF α następuje aktywacja jej receptorów (panel A $5h < t < 6h$, kolor czarny). Aktywne receptory pod nieobecność w komórce A20 (panel J) aktywują dużą ilość białka IKKK (panel B). Duża ilość aktywnego IKKK silnie aktywuje IKK (panel C), co prowadzi do degradacji prawie całego I κ B α w komórce (panel D) i uwolnienia NF- κ B, które następnie przedostaje się do jądra komórkowego (panel E). Obecność w jądrze dużych ilości czynnika transkrypcyjnego prowadzi do aktywacji genów I κ B α i A20 (panele F i G) i następującej po niej produkcji odpowiednich mRNA (panele H i I). Białko I κ B α (panel D, $t \approx 6h$) zsyntetyzowane w cytoplazmie wraca do jądra komórko-

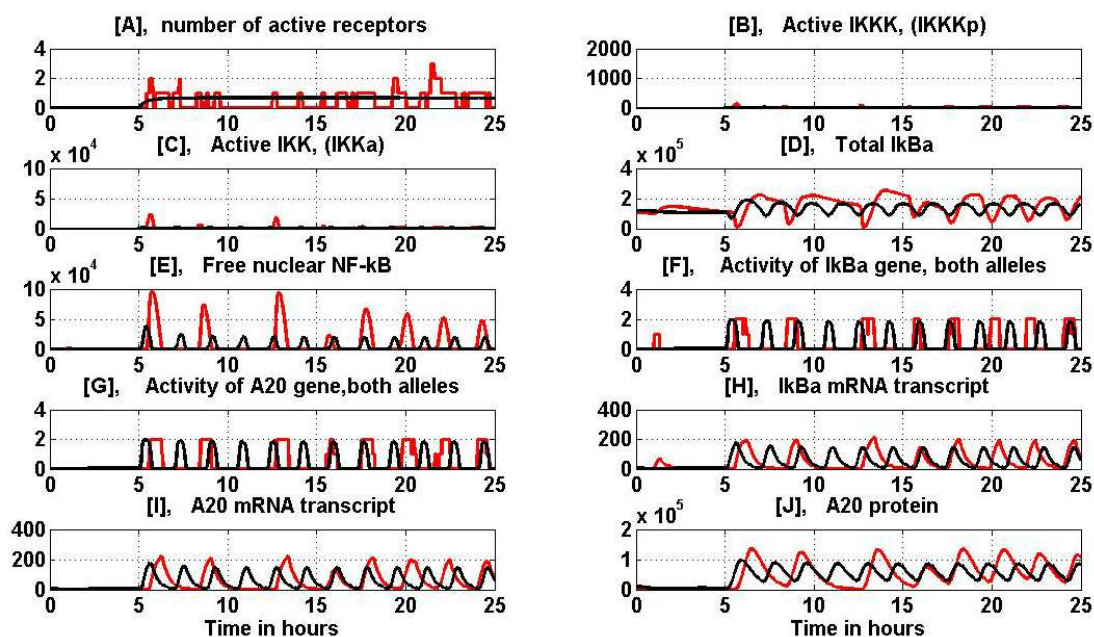


Rysunek 4.8: Zachowanie się modelu przy wymuszeniu ciągłym dawką 10 ng/ml $\text{TNF}\alpha$. Kolorem czerwonym oznaczono przykładową realizację przebiegów modelu stochastycznego, kolorem czarnym zachowanie się przybliżenia deterministycznego.

wego, gdzie wiąże $\text{NF-}\kappa\text{B}$ powodując jego eksport z jądra komórkowego (panel E, $t \approx 6\text{h}$). Powoduje to zatrzymanie transkrypcji genów regulowanych przez $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (panele F i G). Jednocześnie białko A20 (panel J) hamuje aktywację IKKK, co pomimo ciągle obecnego wymuszenia ze strony $\text{TNF}\alpha$ prowadzi do spadku ilości jego aktywnej formy (panel B, $t \approx 6\text{h}$) oraz bezpośrednio przyspiesza dezaktywację IKKa (panel C, $t \approx 6\text{h}$). Nieaktywne geny przestają produkować mRNA w następstwie czego jego poziom spada, pociągając za sobą spadek ilości aktywnych białek $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ i A20. Spadek poziomu A20 umożliwia ponowną aktywację IKK. Jednak poziom aktywnego białka A20 nie jest bliski zeru jak przy pierwszym pikie, a dodatkowo większość IKK znajduje się w stanach pośrednich IKKi oraz IKKii, a nie w mogącym być aktywowanym stanie IKKn, więc następująca skutek działania IKKK aktywacja jest na bardzo niskim poziomie (panel C $t > 6\text{h}$). Poziom ten jest jednak wystarczający by doprowadzić do degradacji pewnej ilości $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, uwolnienia $\text{NF-}\kappa\text{B}$ i uruchomienia transkrypcji. W efekcie w układzie występują oscylacje niegasnące, których amplituda jest sporo niższa od pierwszego pikie (panele A-J, $t > 6\text{h}$).

Model stochastyczny zachowuje się podobnie jak jego deterministyczne przybliżenie z tą różnicą, iż na skutek samoistnej degradacji $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ może dojść do uwolnienia niewielkiej

ilości cząsteczek NF- κ B, które po przedostaniu się do jądra powodują, że prawdopodobieństwo aktywacji genów od nich zależnych jest niezerowe. Prowadzi to do powstania w układzie niepoddanym wymuszeniu stochastycznych fluktuacji (panele D-J, $2.5h < t < 4h$, kolor czerwony). Po stymulacji TNF α uwolnione NF- κ B przedostaje się do jądra, co znacznie zwiększa prawdopodobieństwo aktywacji genów. Podobnie pojawienie się w jądrze I κ B α zwiększa prawdopodobieństwo ich dezaktywacji poprzez przyłączenie się do NF- κ B i jego transport do cytoplazmy. O ile przy pierwszym pikach poziom NF- κ B jest na tyle wysoki, iż prawdopodobieństwo aktywacji wszystkich genów zależnych jest bliskie jedności, to przy następnych niższych pikach NF- κ B jest ono mniejsze, co zostawia margines na to, by dany gen nie ulegnie aktywacji natychmiast, lecz dopiero po pewnym czasie. Podobnie przy dezaktywacji genów, niższy przy początkowym pikach poziom I κ B α zostawia margines na powstanie opóźnienia w dezaktywacji genu. Oba te zjawiska są powodem obserwowanych w przebiegu stochastycznym fluktuacji amplitud (panele B-J, kolor czerwony) oraz obserwowanej eksperymentalnie [68] jak i w modelu [56] silnej synchronizacji wszystkich komórek przy pierwszym pikach odpowiedzi oraz późniejszej ich desynchronizacji.



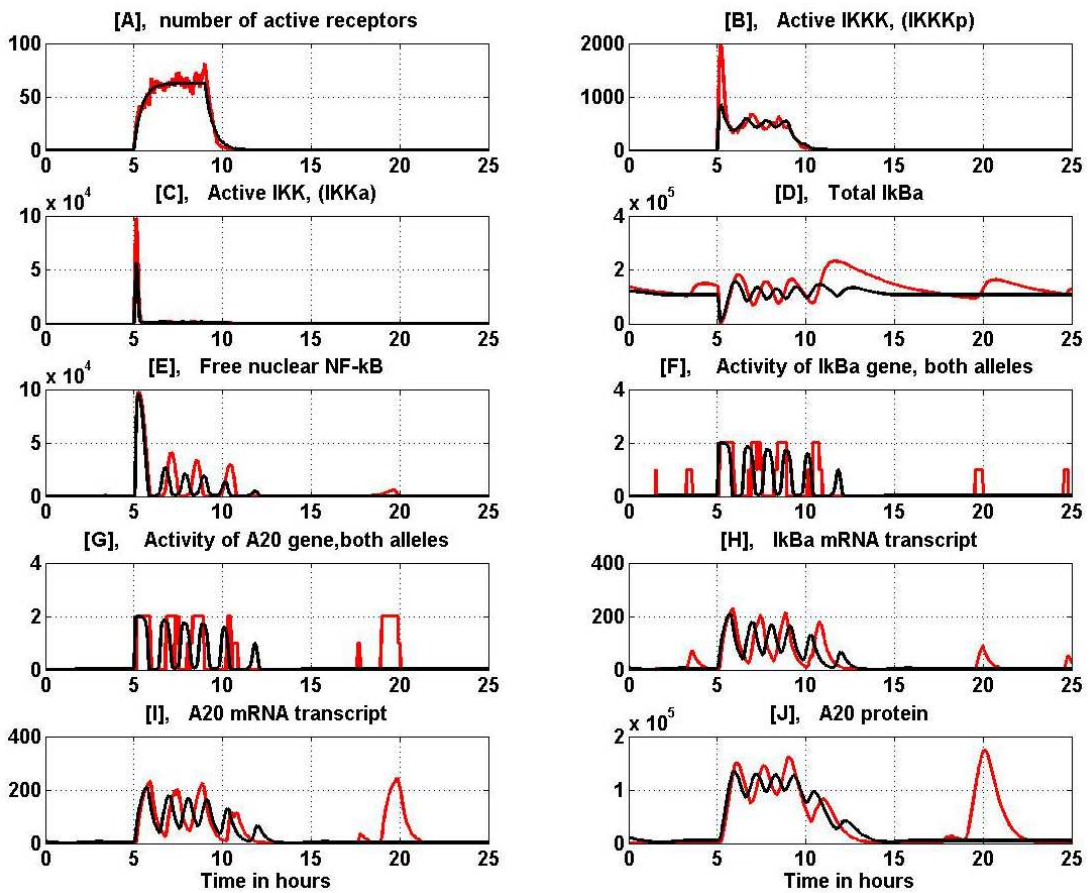
Rysunek 4.9: Zachowanie się modelu przy wymuszeniu ciągłym dawką 0.1 ng/ml TNF α . Kolorem czerwonym oznaczono przykładową realizację przebiegów modelu stochastycznego, kolorem czarnym zachowanie się przybliżenia deterministycznego.

Wymuszenie małą dawką TNF α wynoszącą 0.1 ng/ml ujawnia stochastyczne efekty związane z aktywacją i dezaktywacją receptorów. Przybliżenie deterministyczne (rysunek 4.9 kolor czarny) wskazuje, iż w trakcie trwania wymuszenia aktywny jest cały czas jeden receptor (panel A $t > 5h$), a co za tym idzie, dzięki wzmocnieniu sygnału w kaskadzie sygnałowej, w jądrze komórkowym pojawia się wystarczająca ilość czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (panel E), by aktywować oba geny zależnych od niego białek I κ B α i A20 (panele F i G). W modelu stochastycznym mała dawka TNF α przekłada się na niewielkie prawdopodobieństwo aktywacji receptora. Możliwa jest zatem sytuacja, w której pomimo istnienia w otoczeniu komórki niezerowego stężenia TNF α żaden z receptorów nie zostanie zakt-

wowany (rysunek 4.9, panel A $10h < t < 12h$, kolor czerwony). Brak aktywnego receptora oznacza brak czynnika transkrypcyjnego w jądrze (panel E $10h < t < 12h$), czyli brak aktywacji genów (panele F i G $10h < t < 12h$). Warto zauważyć, iż w sytuacji gdy którykolwiek z receptorów zostanie zaktywowany komórka odpowiada w sposób zdecydowany aktywując obie kopie genów obu białek. Taka strategia zachowania się komórek przy niewielkim wymuszeniu, powodująca, że część z nich ignoruje sygnał, podczas gdy reszta na niego reaguje, przy czym reakcja jest zdecydowana, może okazać się skutecznym mechanizmem obronnym na poziomie tkanki, czyniąc barierę immunologiczną trudniejszą do pokonania.

Odpowiedź modelu na wymuszenie pulsem 4h $TNF\alpha$

Wymuszenie czterogodzinnym pulsem $TNF\alpha$ wykorzystane zostało przy badaniu modelu łącznego, dlatego też omówione zostanie poniżej. Przy braku wymuszenia oraz w początkowych czterech godzinach po aktywacji $TNF\alpha$ układ zachowuje się dokładnie tak jak przy wymuszeniu ciągłym (rysunek 4.10 $t < 9h$). W chwili $t=9h$ zanika wymuszenie. Pociąga to za sobą spadek liczby aktywnych receptorów (panel A, $t > 9h$), co powoduje spadek poziomu aktywnej kinazy IKKK oraz spadek poziomu aktywnego IKK (panel C



Rysunek 4.10: Zachowanie się modelu przy wymuszeniu czterogodzinnym pulsem 10 ng/ml $TNF\alpha$. Kolorem czerwonym oznaczono przykładową realizację przebiegów modelu stochastycznego, kolorem czarnym zachowanie się przybliżenia deterministycznego.

$t > 10h$). Przy braku degradacji poziom I κ B α wraca do poziomu wyjściowego wiążąc ze sobą jądrowe NF- κ B, co powoduje dezaktywację genów I κ B α i A20. Przy braku produkcji nowych protein poziom białka A20 na skutek samoistnej degradacji spada do poziomu bliskiego zeru. W przybliżeniu deterministycznym (kolor czarny) komórka wraca do swojego stanu ustalonego.

Na panelach F-J można wyraźnie zauważyć różnicę w zachowaniu się modelu stochastycznego i przybliżenia deterministycznego. Pierwszą wyraźną różnicą jest aktywacja genów I κ B α i A20 w chwili $t \approx 11.5h$. W przybliżeniu deterministycznym na skutek niewielkiego podniesienia się poziomu NF- κ B w jądrze aktywacji ulegają obydwie geny, przy czym poziom aktywacji wskazuje na to, że uaktywniona została jedna kopia genu I κ B α i jedna A20. W wersji stochastycznej, w której poziomy NF- κ B i I κ B α regulują prawdopodobieństwa przełączeń, szansa na aktywację któregoś z genów przy tak niskim poziomie czynnika transkrypcyjnego była na tyle niewielka, że oba geny pozostały nieaktywne. Z biologicznego punktu widzenia można powiedzieć, iż pomimo, że czynnik transkrypcyjny był obecny w jądrze, to nie zdołał on połączyć się z obszarem promotora odpowiednich genów. Druga wyraźna różnica pomiędzy modelami występuje w chwili $t \approx 20h$. Bliski zeru poziom NF- κ B w jądrze powoduje, iż w przybliżeniu deterministycznym geny pozostają nieaktywne. Jednakże w modelu stochastycznym oznacza to niezerową szansę aktywacji któregoś z genów zależnych od niego transkrypcyjnie. W chwili $t \approx 19.5h$ na skutek samoistnej degradacji I κ B α następuje niewielkie podniesienie poziomu wolnego NF- κ B w jądrze. Ten niewielki wzrost powoduje zwiększenie się szans na aktywację któregoś z genów w efekcie czego zaktywowane zostają oba geny A20 oraz jeden z genów I κ B α . Skutkuje to produkcją odpowiednich mRNA oraz białek. W efekcie losowej aktywacji genów obserwujemy więc dość wyraźną reakcję układu.

Rozdział 5

Istniejące modele modułu regulatorowego p53|Mdm2

5.1 Streszczenie

Rolą modułu regulatorowego p53|Mdm2 jest wykrycie powstałego uszkodzenia DNA, zatrzymanie cyklu komórkowego (nie ujęte w niniejszej pracy), rozpoczęcie naprawy uszkodzonego łańcucha DNA, a jeżeli naprawa jest niemożliwa bądź zajmuje by zbyt dużo czasu, zainicjowanie procesu apoptozy.

W ostatnich latach pojawiło się wiele prac eksperymentalnych wyjaśniających zachowanie się ścieżki sygnałowej p53|Mdm2, powstało jednak stosunkowo niewiele prac teoretycznych próbujących opisać dynamikę badanego układu. Wśród nich można wyróżnić trzy zasadnicze grupy modeli.

Pierwsza grupa to modele proponowane przez zespół naukowców z instytutu Weizmana w Izraelu. Należą do niego między innymi Bar-or [3], Ma [58], Wagner [94] i Batchelor [5]. Cechą wspólną modeli tej grupy jest pominięcie obserwowanej eksperymentalnie bistabilności p53. Skupiają się one na wyjaśnieniu oscylacji obserwowanych w układzie p53|Mdm2 współdziałaniem pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego i występujących w niej opóźnień. Model [5] zawiera dodatkową pętlę ujemnego sprzężenia zwrotnego. Poniżej omówiono modele [58] i [5] jako najbardziej związane z modelem proponowanym w ramach rozprawy.

Drugą grupę stanowią cztery modele zaproponowane przez zespół Tysona do którego należą między innymi Zhang [106] i Ciliberto [13] których prace omówiono poniżej. Proponowane przez nich modele pomijają bistabilność w poziomie p53 jak i opóźnienia skupiając się na wyjaśnieniu oscylacji w układzie współdziałaniem pętli ujemnego i dodatniego sprzężenia zwrotnego.

Trzeci rodzaj podejścia zaprezentowali Wee i Aguda [97]. Pomijają oni w swych rozważaniach obserwowane po uszkodzeniu DNA oscylację skupiając się na zamodelowaniu bistabilności p53 i Akt.

Wymienione powyżej rozwiązania są modelami populacyjnymi, niezdolnymi do oddania zachowania się pojedynczej komórki (u Ma i in. występuje symulacja różnic między komórkami poprzez stochastyczność w czasach opóźnień).

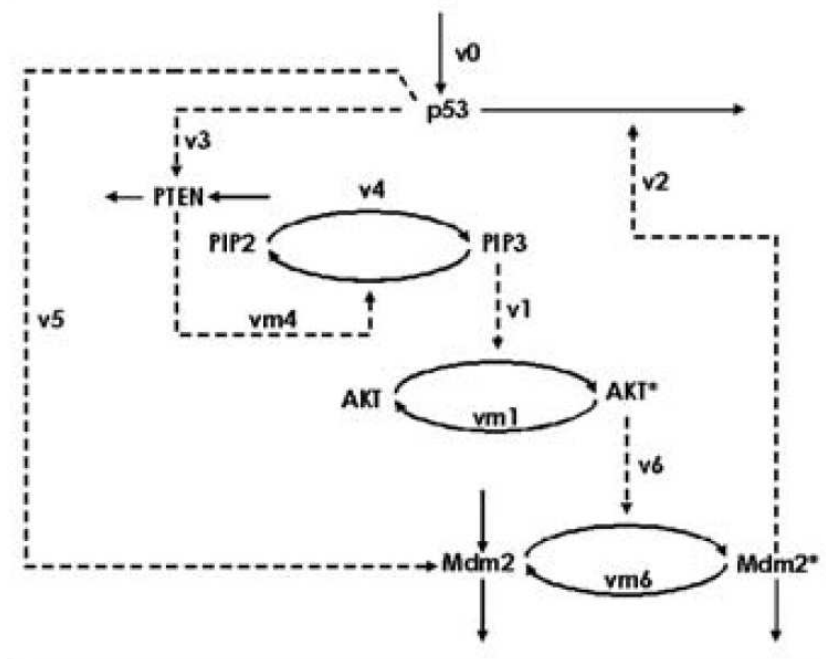
We wszystkich opisanych modelach występuje pętla ujemnego sprzężenia zwrotnego wiążąca czynnik transkrypcyjny p53 z jego inhibitorem Mdm2. W komórkach niepobu-

dzonych Mdm2 znajduje się w stanie wysokim degradując białko p53. W momencie uszkodzenia DNA p53 jest aktywowane poprzez fosforylację (nieujęte w [106] i [13]), co powoduje znaczne zmniejszenia się tempa jego degradacji. Dodatkowo uszkodzenie DNA powoduje znaczący wzrost tempa degradacji Mdm2 (co pominięto w [97]). Sfosforylowane p53 aktywuje gen Mdm2 uruchamiając jego produkcję. Powstałe Mdm2 po translacji i aktywacji przez Akt w cytoplazmie przemieszcza się do jądra komórkowego gdzie degradując p53 powoduje dezaktywację genów p53-zależnych. Prowadzi to do spadku ilości transkryptu i białka Mdm2, a w następstwie spowolnienia degradacji p53, co rozpoczyna kolejny cykl oscylacji.

Kolejne części rozdziału piątego zawierają krótkie omówienie głównych modeli istniejących w literaturze. Ich dokładniejsza analiza znajduje się w naszej pracy Hat i in. [31].

5.2 Model Wee i Aguda

W roku 2006 Wee i Aguda opublikowali pracę próbującą wyjaśnić obserwowaną eksperymentalnie bistabilność występującą w oddziaływaniu p53 z białkiem Akt [97]. W zapro-



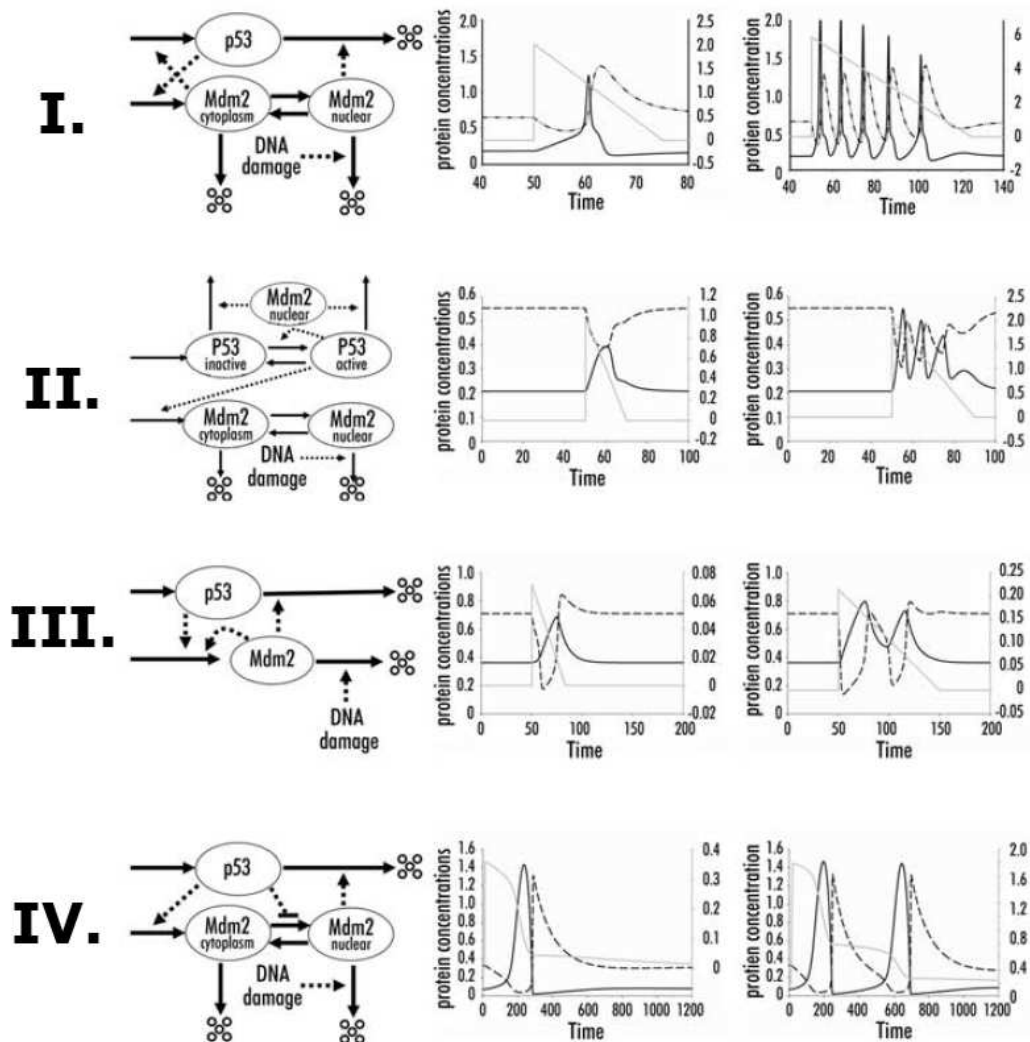
Rysunek 5.1: Model Wee, Aguda [97]. Jedna forma p53. Ujemna i rozbudowana pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego zawierająca PTEN, PIP3 i Akt. Układ nie wykazuje oscylacji, występuje w nim jedynie bistabilność poziomów białek p53 i Akt

nowanym przez nich modelu występuje jedna forma p53 (rysunek 5.4) oraz pętla ujemnego i dodatniego sprzężenia zwrotnego. Sprzężenie dodatnie zawiera białka pośrednie: transkrypcyjnie zależny od p53 PTEN, dezaktywowane przez PTEN białko PIP3 które w formie aktywnej potrzebne jest do fosforylacji Akt. Sfosforylowane białko Akt aktywuje Mdm2 umożliwiając jego transport do jądra i degradację p53. Aktywacja układu następuje na skutek uszkodzenia DNA które powoduje zmniejszenie tempa degradacji p53 (jak zakłada-

ją autorzy stabilność p53 rośnie wraz z poziomem uszkodzenia DNA). Sprzężenie dodatnie powoduje bistabilność układu. Wysoki poziom p53 i niski poziom Akt autorzy utożsamiają ze stanem apoptotycznym podczas gdy niski poziom p53 i wysoki Akt ze stanem przeżyciowym. W modelu nie uwzględniono procesów naprawy materiału genetycznego. Pominięto wpływ jego uszkodzenia na tempo degradacji białka Mdm2, które to oddziaływanie jak pokazano w rozdziale szóstym (rysunek 6.5) jest konieczne do wystąpienia obserwowanych eksperymentalnie oscylacji w poziomach p53 i Mdm2.

5.3 Modele grupy Tysona

W roku 2007 grupa Tysona analizując przyczyny powstawania po uszkodzeniu DNA oscy-



Rysunek 5.2: Cztery warianty modelu grupy Tysona [106]. W pierwszej kolumnie model, w drugiej odpowiedź na niewielkie uszkodzenie DNA, w trzeciej odpowiedź na duże uszkodzenie DNA. Linia ciągła - p53, linia przerywana - Mdm2 w jądrze, linia szara - uszkodzenie DNA.

lacji w układzie p53|Mdm2 przedstawiła cztery warianty współdziałania pętli ujemnego i dodatniego sprzężenia zwrotnego [106] (rysunek 5.5). Wszystkie białka w zaproponowanych modelach poza p53 i Mdm2 występują jedynie *implicite*. W każdym z modeli występuje opisane powyżej ujemne sprzężenie zwrotne, każdy aktywowany jest poprzez pojawienie się uszkodzenia DNA które oddziałuje na układ poprzez zwiększenie tempa degradacji białka Mdm2. Pominięto proces apoptozy, a naprawa DNA następuje ze stałą prędkością i jej tempo nie jest zależne od któregośkolwiek z poziomów p53 czy Mdm2. We wszystkich wariantach zaniedbano występujące w układzie opóźnienia. Stabilizację p53 na skutek uszkodzenia DNA pominięto, co jak pokazano na rysunku 6.5 wyklucza istnienie w modelu bistabilności. Modele posiadają jeden punkt stabilny w przypadku gdy DNA jest nienaruszone oraz cykl graniczny w przypadku istnienia jego uszkodzenia (rysunek 5.5). Poszczególne modele różnią się głównie formą sprzężenia dodatniego.

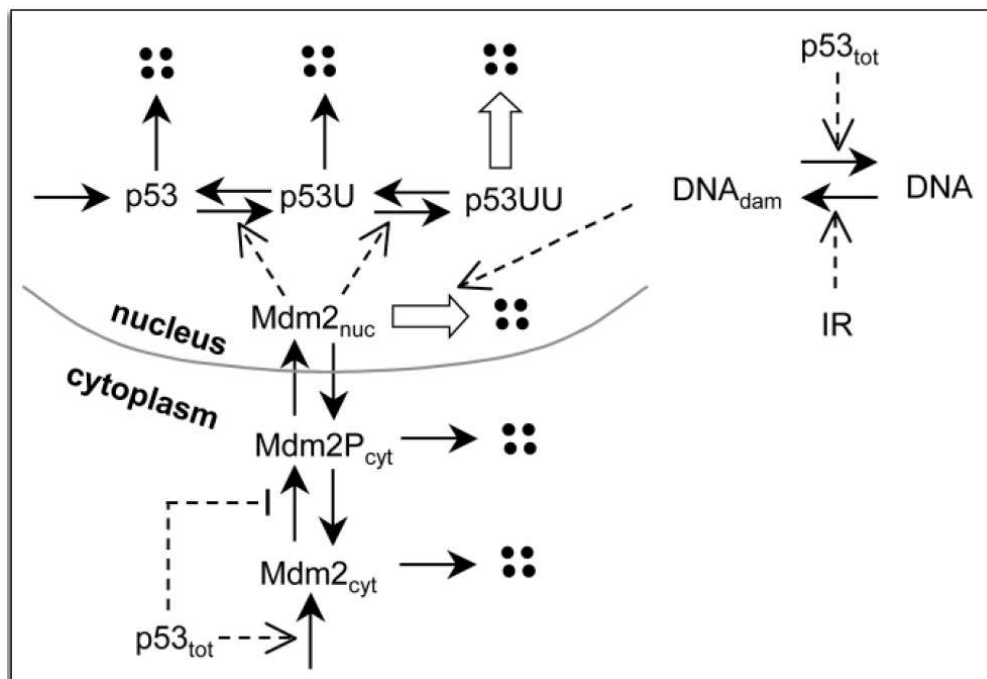
W pierwszym modelu (rysunek 5.5 I) występują dwie formy Mdm2, cytoplazmatyczna i jądrowa. Mdm2 cytoplazmatyczne aktywuje swój czynnik transkrypcyjny p53 (pętla dodatnia), forma jądrowa przyspiesza degradację p53. Uszkodzenie DNA zwiększa tempo degradacji jądrowego Mdm2.

Wariant drugi (rysunek 5.5 II) zawiera dwie formy Mdm2 - cytoplazmatyczną i jądrową oraz dwie formy p53 - nieaktywne i aktywne. Jądrowe Mdm2 degraduje obie formy p53 i jego degradacja jest przyspieszana w wyniku uszkodzenia DNA. Pętla dodatniego sprzężenia wynika z faktu przyspieszania przez aktywne p53 swej własnej aktywacji.

W trzecim wariacie (rysunek 5.5 III) zawarto tylko jedną formę Mdm2 której degradacja wzrasta w momencie uszkodzenia DNA i jedną formę p53. Mdm2 znacznie przyspieszając swą własną produkcję tworzy pętle dodatniego sprzężenia.

Czwarty wariant (rysunek 5.5 IV) jest tożsamy z modelem Ciliberto i in. [13] z 2005. Model [13] jako najbardziej związany z zaproponowanym w niniejszej rozprawie opisany jest dokładniej poniżej.

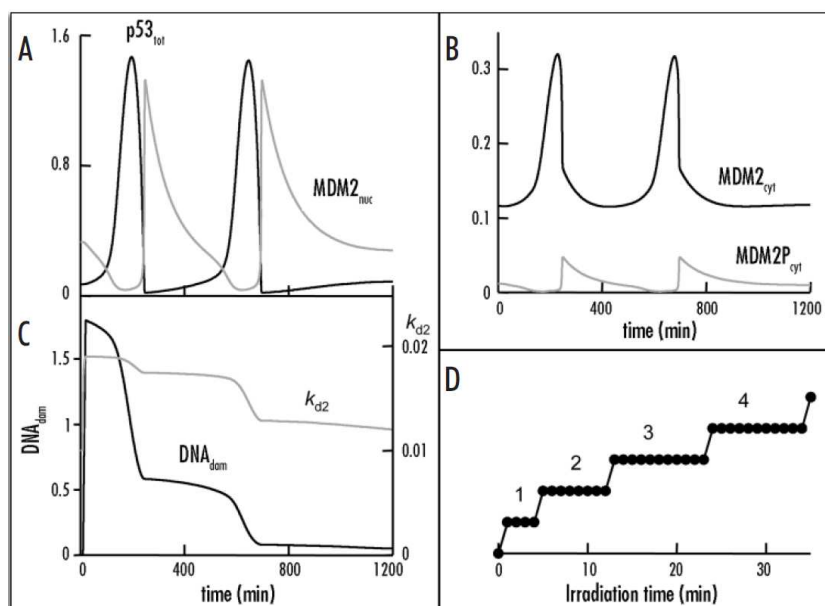
W modelu [13] występują trzy formy jądrowego p53: normalna, z przyłączoną jedną ubikwityną oraz z dwiema ubikwitynami. Formy te różnią się tempem degradacji przy czym pierwsza z nich jest najstabilniejsza, a trzecia najszybciej ulega degradacji. Kolejne ubikwitynacje wymuszone są przez jądrowe Mdm2, które tym samym działa jak inhibitor p53. Tempo produkcji Mdm2 zwiększa się wraz ze wzrostem całkowitej ilości czynnika transkrypcyjnego p53, którego wysoki poziom blokuje jednocześnie aktywację (fosforylację) nowo zsyntetyzowanego Mdm2 uniemożliwiając jego transport do jądra komórkowego. Cały układ aktywowany jest poprzez powstanie na skutek promieniowania uszkodzenia DNA, co pociąga za sobą zwiększenie tempa degradacji jądrowego Mdm2. Tempo naprawy DNA jest zależne od całkowitego stężenia p53. W modelu występują dwie pętle sprzężenia zwrotnego. Sprzężenie ujemne związane jest z faktem, iż p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym swojego własnego inhibitora Mdm2. Sprzężenie dodatnie wynika z faktu blokowania aktywacji Mdm2 przez p53, co uniemożliwia mu przenikanie do jądra i spełnianie roli inhibitora. W modelu autorzy zastosowali szereg uproszczeń z których najważniejszym jest znaczące skrócenie pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego. Pominięto białka PTEN, PIP3 i Akt, więc blokada aktywacji Mdm2 w cytoplazmie zachodzi bez żadnego opóźnienia, co zasadniczo zmienia dynamikę układu. Zgodnie z przewidywaniem [13] Mdm2 kumuluje się w cytoplazmie, a następnie gwałtownie przemieszcza się do jądra (rysunek 5.2), co nie jest obserwowane eksperymentalnie. W efekcie mamy do czynienia z oscylacjami które są wynikiem współdziałania pętli ujemnego i dodatniego sprzężenia zwrotnego. W [13] nie uwzględniono procesu apoptozy ani wpływu uszkodzenia DNA na stabilizację p53, tak



Rysunek 5.3: Model Ciliberto i in. [13]. Występują w nim trzy formy p53 z 0, 1, 2 ubikwitynami, im więcej ubikwityn tym szybsze tempo degradacji. Pętla ujemnego sprzężenia zwrotnego wiąże p53 z jego inhibitorem Mdm2. Pętla dodatniego sprzężenia w której p53 blokuje aktywację Mdm2 jest zbytnio skrócona.

więc niezależnie od dawki promieniowania komórka zawsze ulega wyleczeniu. Wielkość przyjętego promieniowania, a więc wielkość uszkodzenia DNA następującego w jego wyniku, wpływa w modelu na ilość pulsów p53 jakie pojawią się w układzie przed całkowitym wyleczeniem.

Uzależnienie istnienia oscylacji od współdziałania pętli ujemnego i dodatniego sprzężenia zwrotnego powoduje, że modele grupy Tysona są niezwykle czułe na zmianę parametrów. Przykładowo zmiana tempa syntezy p53 w [13] o 10% powoduje, iż oscylację w układzie występują nawet pomimo braku uszkodzenia DNA. Eksperymenty biologiczne na pojedynczych komórkach oparte są zazwyczaj na transfekcji która zwiększając liczbę kopii danego genu zwiększa tempo jego produkcji znacznie bardziej niż o 10%, więc prawidłowo działający model powinien wykazywać znaczną odporność na takie zmiany. Dokładna analiza wpływu zmiany liczby kopii genów na zachowanie się modeli między innymi grupy Tysona znajduje się w naszej pracy [31]. Pokazaliśmy w niej, że aby uzyskać oscylacje o stałym okresie takie jak obserwowane w eksperymencie Geva-Zatorsky i in. [24], a dodatkowo zapewnić ich występowanie dla szerokiego przedziału parametru bifurkacyjnego, związanego z poziomem uszkodzenia DNA, konieczne jest ich oparcie o bifurkacje nadkrytyczną Hopfa, występującą na skutek współdziałania pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego i występujących w niej opóźnień. Modele proponowane przez grupę Tysona oparte są o bifurkację podkrytyczną Hopfa ([106] I i III) bądź siodło-węzeł (SNIC - saddle-node-on-invariant-circle, [106] II). W modelu [13] ([106] IV) oscylacje pojawiają się po przejściu przez bifurkację siodło-węzeł lub nadkrytyczną Hopfa w zależności od ilości kopii genów, przy czym tylko w przypadku bifurkacji nadkrytycznej oscylacje zachowują okres i wystę-



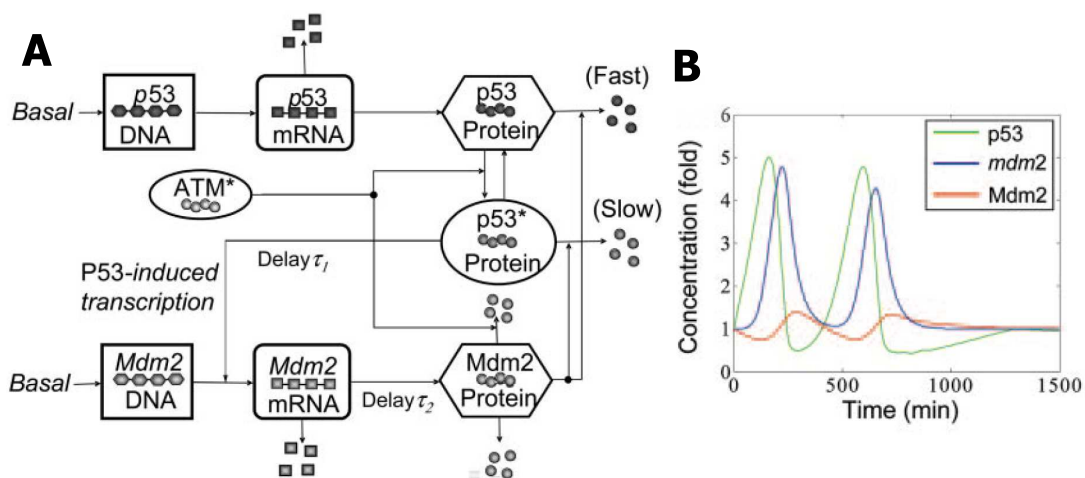
Rysunek 5.4: Wynik symulacji modelu Ciliberto i in. [13]. Na początku symulacji model znajduje się w stanie ustalonym. W przedziale czasu 10-20 minut podawane jest wymuszenie w postaci promieniowania IR. [A] Odpowiedź układu na wymuszenie - przebiegi całkowitej ilości p53 i Mdm2 w jądrze. [B] Przebiegi cytoplazmatycznych form Mdm2. [C] Oscylacje w układzie są efektem zwiększenia wartości współczynnika degradacji Mdm2 (k_{d2}) przez uszkodzenie DNA. Gdy DNA ulega naprawie k_{d2} wraca do swej wartości bazowej. [D] Ilość pulsów przed powrotem do stanu ustalonego zależy od stopnia uszkodzenia DNA wynikającego z czasu naświetlania. Dłuższy czas naświetlania oznacza większą dawkę i większą ilość pulsów

pują przy dość dużej rozpiętości ilości uszkodzeń DNA.

W układzie p53|Mdm2 występuje pętla dodatniego i ujemnego sprzężenia zwrotnego, a do uzyskania odpornych oscylacji wystarcza pętla ujemnego sprzężenia wraz z występującym w niej opóźnieniem, więc można spodziewać się, że sprzężenie dodatnie pełni inną rolę niż założyła to grupa Tysona. Sprzężenie dodatnie może jak założyli Wee i Aguda [97] zapewniać bistabilność. Występujące w nim opóźnienie może zaś służyć odmierzeniu czasu do zainicjowania procesu apoptozy. Rozwiązanie takie zostało zaproponowane w ramach niniejszej rozprawy w rozdziale szóstym.

5.4 Model Ma i in. (2005)

Model Ma i in. [58] podobnie jak [13] próbuje wyjaśnić obserwowane w komórkach oscylacje poziomów p53 i Mdm2 występujące po uszkodzeniu DNA. W modelu tym nie występuje dodatnie sprzężenie zwrotne, a oscylacje pojawiają się dzięki pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego oraz znajdującym się w niej opóźnieniom związanym z transkrypcją i translacją Mdm2 (rysunek 5.3a). W [58] mamy dwa stany p53, normalny i aktywny oraz jedną postać białka Mdm2. Białko p53 aktywowane jest poprzez sfosforylowane cząsteczki ATM pojawiające się w przypadku obecności uszkodzenia DNA. Oprócz aktywacji p53 ATM

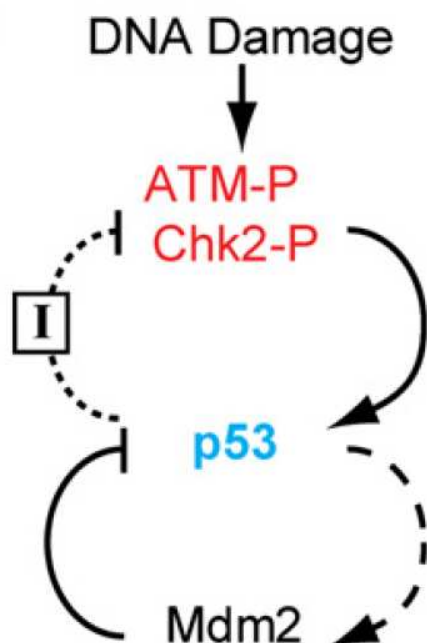


Rysunek 5.5: [A] Model Ma i in. [58]. Dwie formy p53: nieaktywna i po aktywacji przez ATM które jest przekaźnikiem informacji o uszkodzeniu DNA. Widoczne opóźnienia narzucone na transkrypcję i translację Mdm2. [B] Odpowiedź modelu Ma na wymuszenie dawką 5 Gy. Zielony - p53, niebieski - Mdm2 mRNA, czerwony - białko Mdm2

odpowiedzialne jest również za wzrost tempa degradacji Mdm2. Aktywne p53 posiada wolniejsze tempo degradacji i w odróżnieniu od modelu [13] tylko ono odgrywa rolę czynnika transkrypcyjnego dla Mdm2. Autorzy przyjęli istnienie dwóch rodzajów uszkodzeń DNA (wolno i szybko naprawialnych), ograniczenie na ilość kompleksów naprawczych (20) oraz zastosowali stochastyczny model naprawy DNA. Brak pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego sprawia, że po napromieniowaniu uszkodzone DNA zawsze zostaje naprawione i komórka przeżywa. W [58] występują zatem dwa stany układu: cykl graniczny w trakcie istnienia uszkodzenia DNA oraz stan ustalony gdy DNA jest nieuszkodzone (rysunek 5.3b). Nasza analiza [31] wykazała, iż model [58] osiąga cykl graniczny poprzez bifurkację nadkrytyczną Hopfa i odporny jest na zmianę ilości kopii genów [31].

5.5 Model Batchelora i in. (2008)

W roku 2008 Batchelor i in. zaproponowali model ścieżki sygnałowej p53 rozbudowany o moduł kinaz ATM i Chk2 będących aktywatorami p53 [5]. Model posłużył do oddania obserwowanych eksperymentalnie zaburzeń w oscylacjach układu p53|Mdm2 występujących po zablokowaniu ujemnego sprzężenia zwrotnego między p53 i jego aktywatorami. Model [5] zawiera pięć rodzajów molekuł: nieaktywne p53, aktywne p53, jedną formę Mdm2 oraz białka zwane przez autorów "signal" i "inhibitor". Białkami sklasyfikowanymi jako "signal" są cząsteczki zaangażowane w przekazanie informacji o powstałym w komórce uszkodzeniu DNA do modułu p53|Mdm2 takie jak aktywne formy ATM czy Chk2. Powodują one aktywację p53 i przyspieszenie degradacji Mdm2. "Inhibitor" to kinazy transkrypcyjnie zależne od aktywnego p53 takie jak Wip1 odpowiedzialne za dezaktywację kinaz "signal". Autorzy pominieli proces uszkodzania i naprawy DNA oraz apoptozę. Założyli, że pojawienie się uszkodzenia DNA powoduje rozpoczęcie produkcji białek "signal" zgodnie z funkcją skokową Heaviside'a, co przy działających obu pętlach ujemnego sprzężenia zwrotnego (p53-Mdm2 i "signal"-p53-"inhibitor") prowadzi do cyklu granicz-



Rysunek 5.6: Model Batchelora i in. [5]. W modelu występują dwie pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego. Pierwsza łączy p53 z jego inhibitorem Mdm2, druga powoduje blokowanie przez p53 swego aktywatora.

nego. Zablokowanie działania "inhibitora" (pozbawienie komórek białka Wip1) prowadzi do zaniku oscylacji i pojawienia się wysokiego poziomu białek "signal", co z kolei powoduje zanik oscylacji w poziomach p53 i Mdm2. Zgodnie z postulatem autorów istnienie niezaburzonego sprzężenia zwrotnego łączącego p53 z jego aktywatorami jest niezbędne do podtrzymania oscylacji w module regulatorowym p53|Mdm2.

Model [5] w którym cykl graniczny pojawia się poprzez bifurkację nadkrytyczną Hopfa odporny jest na zmianę ilości kopii genów [31].

Rozdział 6

Model ścieżki sygnałowej p53|Mdm2

6.1 Streszczenie

Harris i Levine [29] opisują 10 sprzężeń (trzy dodatnie i siedem ujemnych) kontrolujących działanie czynnika transkrypcyjnego p53, zawierających między innymi białka p19/14 ARF, p21, p38, p73. Najważniejszymi wydają się jednak wykorzystane w poprzednio omówionych modelach sprzężenia zawierające Mdm2, PTEN, PIP3 i Akt i na nich skupiłem się w rozprawie.

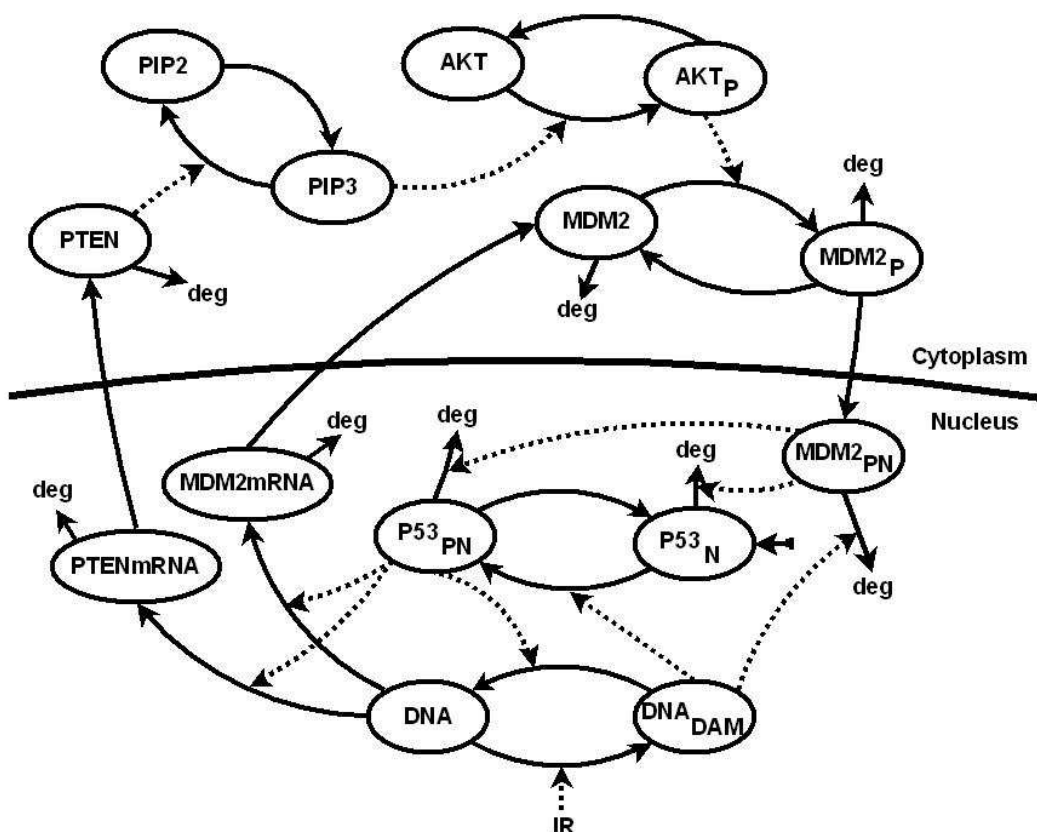
Rozdział szósty poświęcony jest stworzonemu przez nas [76] stochastycznemu modelowi modułu regulatorowego p53|Mdm2. Model ten prezentuje całkowicie odmienną, bogatszą od istniejących modeli dynamikę, wynikającą z faktu uwzględnienia dużego opóźnienia występującego w pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego. Pętla dodatniego sprzężenia pełni w naszym modelu rolę przełącznika odpowiedzialnego za skierowanie komórki na ścieżkę apoptozy w momencie gdy naprawa DNA jest nieefektywna. Otrzymane w eksperymentach symulacyjnych rezultaty są zgodne z istniejącymi danymi eksperymentalnymi dotyczącymi zachowania się elementów badanej ścieżki. Prezentowany model stochastyczny jest w stanie oddać obserwowane w doświadczeniach zachowanie się pojedynczych komórek, których rezultaty dostępne są w literaturze.

Jak pokazała wykonana przez nas analiza (Hat i in. [31]), zaproponowany model oparty o bifurkację nadkrytyczną Hopfa posiada dużą odporność na zmianę liczby kopii genów p53 i Mdm2, co oznacza, że pomimo, iż jest on dopasowywany do eksperymentów z transfekowanych komórek, jest w stanie oddawać również zachowanie komórek normalnych, niemodyfikowanych. Model przedstawiony w powyższym rozdziale posłużył jako podstawa do budowy modelu łączącego sieć NF- κ B i p53, przedstawionego w rozdziale siódmym.

W drugiej części rozdziału umieszczono opis struktury stworzonego modelu ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystanej wiedzy biologicznej, na której jest on oparty. W części trzeciej przedstawiono opis zmiennych i parametrów (wraz z wartościami) występujących w zbudowanych równaniach jak i przedstawiono same równania modelu stochastycznego. Część czwarta prezentuje przybliżenie deterministyczne. Następująca po niej część przedstawia rezultaty symulacji modelu stochastycznego i jego przybliżenia deterministycznego ze zwróceniem uwagi na trzy różne scenariusze symulacji jak i przewidywania modelu co do losu pojedynczej komórki i populacji 200 komórek.

6.2 Struktura modelu

Stworzony w ramach rozprawy model układu regulatorowego p53|Mdm2 opublikowany w [76] zakłada dwukompartmentalną kinetykę p53, jego głównego inhibitora Mdm2, fosfatazy PTEN, fosfatydyloinozytolu 3-fosforu PIP3 i kinazy AKT. Poziom białka p53 i jego aktywność transkrypcyjna są regulowane przez dwie pętle sprzężenia zwrotnego: ujemnego obejmującą Mdm2 i p53 oraz dodatniego, która zawiera białka PTEN, PIP3 i Akt (Rysunek 6.1).



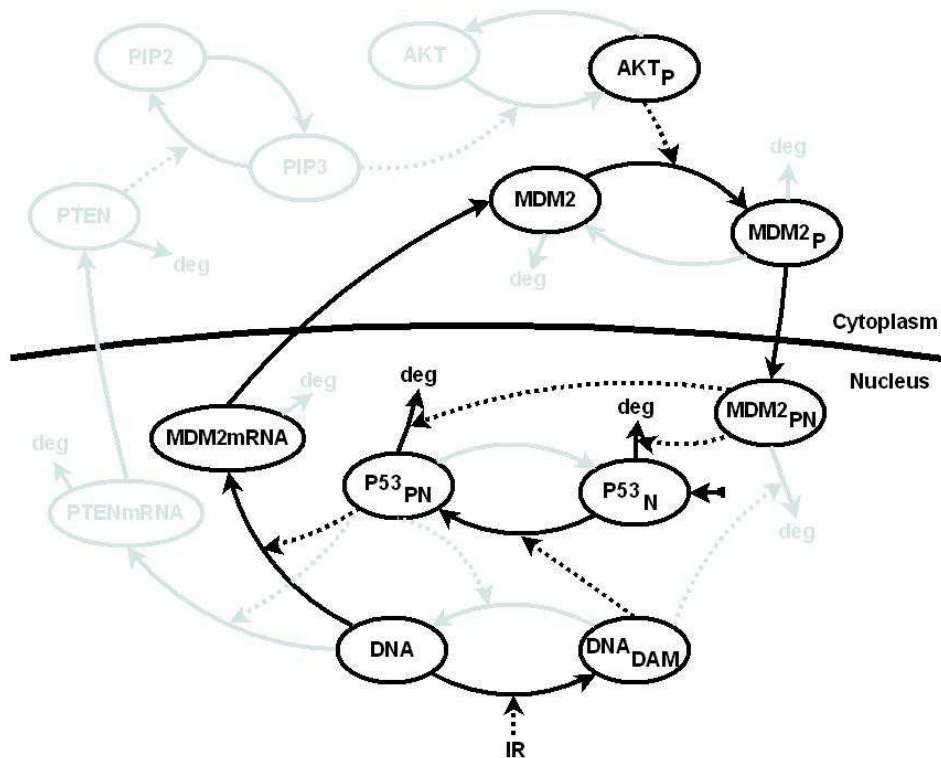
Rysunek 6.1: Model układu regulatorowego p53|Mdm2 zawierający sprzężenie ujemne i długą pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego. Linie ciągłe oznaczają przejścia pomiędzy stanami, linie przerywane - oddziaływania między białkami.

Sprzężenie ujemne wynika z faktu, że sfosforylowane białko p53 aktywuje transkrypcję Mdm2. Mdm2 po zaktywowaniu przez Akt w cytoplazmie zostaje przetransponowane do jądra komórkowego gdzie ubikwitynuje p53, doprowadzając do jego gwałtownej degradacji. Druga pętla sprzężenia zwrotnego jest pętlą sprzężenia dodatniego w tym sensie, iż blokuje działanie pętli sprzężenia ujemnego. W skrócie p53 indukuje produkcję PTEN, który następnie dezaktywuje PIP3 hydrolizując go do PIP2, niezdolnego do aktywacji Akt. W rezultacie p53 blokuje swój własny inhibitor Mdm2, gdyż ten bez aktywacji za pomocą aktywnej formy białka Akt nie może wnikać do jądra, a tym samym nie może przyspieszać degradacji p53.

Poniżej zawarto główne elementy wiedzy biologicznej i założenia, na których oparty jest model.

Pętla ujemnego sprzężenia zwrotnego

Ilość białka p53 w komórce jest regulowana głównie poprzez tempo jego degradacji, nie zaś przez tempo jego produkcji [64]. Biogeneza białka p53 obejmuje dimeryzację w momencie translacji jak i potranslacyjną dimeryzację dimerów [70]. Dimeryzacja dimerów jest procesem mało wydajnym, stała dysocjacji w równowadze dimer-tetramer wynosi ok $3 \mu\text{M}$, jednakże dimery p53 łącząc się w jądrze do obszaru promotora wykazują dużą skłonność do wzajemnego zwiększania swego powinowactwa [99], czego odzwierciedleniem jest współczynnik Hilla wynoszący 1.8 (dimer:DNA). W [99] wykazano, że zmutowane p53 niezdolne do tworzenia tetramerów wykazuje ponad sześciokrotnie mniejsze powinowactwo do DNA niż białko niezmutowane. Oznacza to, że podstawową aktywną formą p53 jest tetramer. Dodatkowo Meek oraz Brooks i Gu w [61], [62] i [9] wykazali, że fosforylacja p53 znacznie zwiększa aktywność p53 jako czynnika transkrypcyjnego. Zgodnie z powyższymi



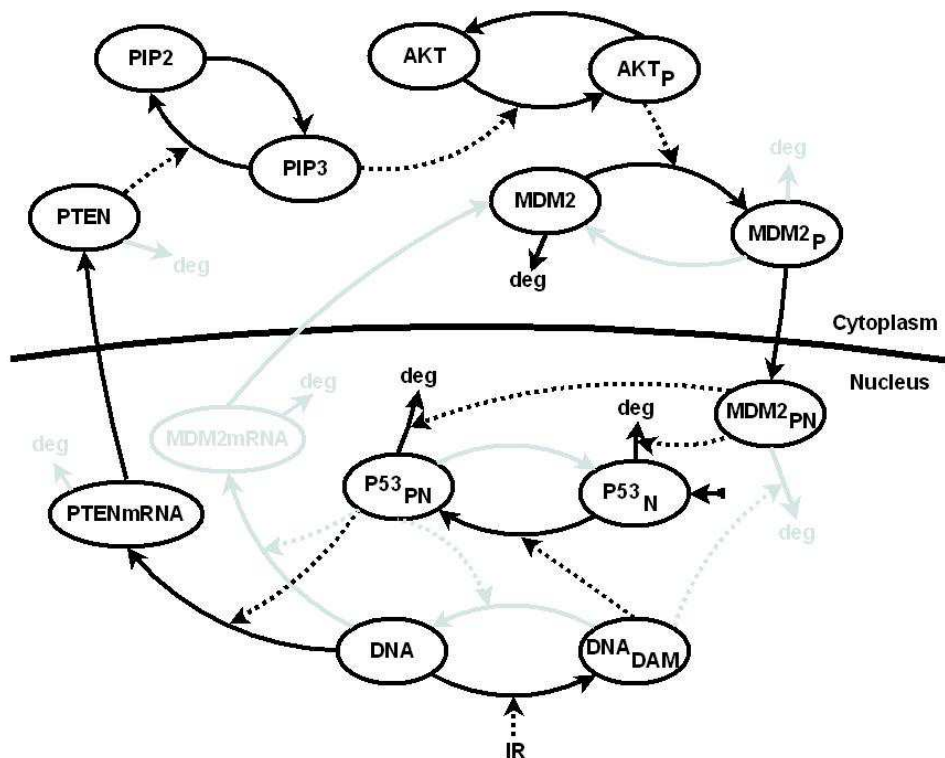
Rysunek 6.2: Ujemne sprzężenie zwrotne w modelu p53|Mdm2. Linie ciągłe oznaczają przejścia pomiędzy stanami, linie przerywane - oddziaływania między białkami.

informacjami przyjęto uproszczenie polegające na tym, że p53 jest produkowane z pewną stałą wydajnością jako dimer i natychmiast zostaje przeniesione do jądra komórkowego, gdzie może dzięki fosforylacji uzyskać zdolność inicjacji procesu transkrypcji. Założono ponadto, że tempo aktywacji transkrypcji genów zależnych od p53 (Mdm2 i PTEN) jest proporcjonalne do kwadratu ilości sfosforylowanej formy p53. W celu uzyskania zdolności translokacji do jądra komórkowego Mdm2 musi zostać zaktywowane przez białko Akt, które fizycznie łączy się z nim fosforylując je w miejscu Ser166 i Ser186 [59], [107]. Po fosforylacji Mdm2 może poruszać się pomiędzy jądrem i cytoplazmą. Zgodnie z powyższym

założono, że w cytoplazmie znajdują się obie formy Mdm2 sfosforylowana i niesfosforylowana, natomiast w jądrze komórkowym jedynie sfosforylowana. Znajdujące się w jądrze białko Mdm2 odpowiada za przyłączenie pierwszej ubikwityny do p53, inicjalizując w ten sposób proces jego poliubikwitynacji [32], katalizowany również poprzez inne enzymy jak np. p300. Wielokrotnie zubikwitynowane białko p53 ulega degradacji bezpośrednio w jądrze bądź zostaje przetransportowane do cytoplazmy i zdegradowane przez proteasom 26S [85]. Fosforylacja p53 prowadzi do jego acetylacji, która chroni p53 przed ubikwitynacją zależną od Mdm2 i następującą po tym degradacją [7]. W pracy założono, że tempo degradacji p53 jest sumą pewnego tempa stałego i zależnego od ilości Mdm2 w jądrze, przy czym część zależna od Mdm2 modelowana jest przy wykorzystaniu funkcji Hilla ze współczynnikiem Hilla równym 2. Ponadto współczynnik degradacji sfosforylowanego p53 jest dziesięciokrotnie mniejszy niż nie sfosforylowanego.

Pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego

Jak pokazano w [84] fosfataza PTEN jest transkrypcyjnie zależna od p53, zaś ilość jej mRNA wzrasta około 3-4 krotnie po naświetlaniu komórek dawką 10 Gy przez 16 godzin. PTEN hydrolizuje PIP3 produkowany przez zaktywowaną fosfatydyloinozytol 3-kinazę (PI3K) do PIP2 [14]. Do aktywacji Akt potrzebny jest PIP3 a nie PIP2, więc PTEN



Rysunek 6.3: Dodatnie sprzężenie zwrotne w modelu p53|Mdm2. Linie ciągłe oznaczają przejścia pomiędzy stanami, linie przerywane - oddziaływania między białkami.

działa jak inhibitor Akt. Aktywny Akt jest potrzebny do aktywacji Mdm2 umożliwiając tym samym jego transport do jądra komórkowego. W ten sposób p53 działając poprzez PTEN, PIP3 i Akt tworzy pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego, hamując aktywację swo-

jego własnego inhibitora Mdm2. W modelu założono, że całkowita ilość PIP (PIP2+PIP3) oraz Akt jest stała, czyli na przykład istnieje równowaga pomiędzy procesami ich produkcji i degradacji. Dodatkowo w modelu pominięto znaną z literatury możliwość bezpośredniego oddziaływania PTEN na p53 w sposób niezależny od Akt, gdzie PTEN zwiększa stabilność p53 [20] lub też zmniejsza transkrypcje Mdm2 przez blokadę jego promotora P1 [10].

Aktywacja układu

Układ regulatorowy p53 odpowiada na wiele sygnałów zewnętrznych, zaś jego aktywacja jest regulowana przez szereg kinaz. Uszkodzenie DNA, promieniowanie jonizujące czy stres rakotwórczy prowadzą do modyfikacji p53 (fosforylacja, acetylacja i inne) zwiększającej jego stabilność i uaktywniającej jego działanie transkrypcyjne [7]. Innym sposobem na zwiększenie aktywności p53 jest zablokowanie lub degradacja jego inhibitora Mdm2. Można tego dokonać poprzez ekspresję onkogenów [90], które blokują Mdm2 poprzez aktywację p14^{ARF} lub przez uszkodzenie DNA, które zwiększa jego tempo autodegradacji. Najczęściej rozpatrywanym sposobem aktywacji modułu p53 jest uszkodzenie DNA. Dawka jednego Gy promieniowania prowadzi do około 35-40 podwójnych przerwań nici DNA (DBS - double strand brakes) [50], [79]. Powstałe uszkodzenie jest wykrywane przez tak zwane proteiny kontrolne i kinazy takie jak ATM, ATR, DNAPK, Chk1, Chk2, JNK i kinaza P38, które następnie przekazują sygnał do białek p53 i Mdm2. Szczególnie czułym i szybkim detektorem uszkodzeń DNA jest ATM. Bakkenist i Kastan w [2] pokazują, że ATM jest fosforylowane w Ser 1981 w 5 minut po napromienieniu komórki, a jego aktywacja zaczyna się przy dozie promieniowania rzędu 0,1-0,2 Gy by osiągnąć nasycenie przy 0,4 Gy. W rezultacie aktywacji ATM p53 jest fosforylowane w wielu miejscach: Ser 15, 20, 33, 37, 315, 392 (z czego Ser 15 jest prawdopodobnie najważniejsze), co prowadzi do jego stabilizacji i zwiększenia aktywności transkrypcyjnej [1], [7]. Jednocześnie z aktywacją p53, uszkodzenie DNA poprzez zależne od niego kinazy (głównie ATM) powoduje fosforylację Mdm2, co prowadzi do znacznego zwiększenia jego auto ubikwitynacji i degradacji przez proteazy [85], [86] i [63]. Stommel i Wahl w [85] wykazali, że przy uszkodzeniu DNA okres półtrwania Mdm2 spada około siedmiokrotnie w ciągu 5 minut. W modelu dokonano szeregu uproszczeń w stosunku do wiedzy eksperymentalnej. Założono, że p53 może istnieć w dwóch formach: aktywnej i nieaktywnej. Tylko aktywna forma posiada zdolności transkrypcyjne i odpowiednio niższy współczynnik degradacji zależnej od Mdm2. Założono również, że promieniowanie IR prowadzi do uszkodzenia DNA zgodnie z procesem Poissona. Kolejne założenie polega na tym, że uszkodzenie DNA oddziałuje na p53 i Mdm2 (poprzez ATM lub inne kinazy nie modelowane bezpośrednio) z siłą daną funkcją Hilla zależną od liczby DSB (N). Współczynnik Hilla w tym odwzorowaniu równy jest 2, a próg pół-nasyceń 7 DBS, co odpowiada dawce ok 0.2 Gy. Podsumowując, założono, że tempo przejścia z nieaktywnej do aktywnej formy p53 wynosi

$$\left(a_0 + a_1 \frac{N^2(t)}{h_0^2 + N^2(t)} \right) \quad (6.1)$$

a tempo degradacji Mdm2 jest równe

$$\left(d_0 + d_1 \frac{N^2(t)}{h_0^2 + N^2(t)} \right). \quad (6.2)$$

Transkrypcja i translacja

Podobnie jak w modelu [56] omówionym w rozdziale czwartym, założono, iż stan każdego z dwóch genów regulowanych przez p53 jest sumą stanów jego kopii: $G_M = G_{M1} + G_{M2}$, $G_M \in \{0, 1, 2\}$ dla Mdm2 i $G_P = G_{P1} + G_{P2}$, $G_P \in \{0, 1, 2\}$ dla PTEN. Tempo aktywacji każdej kopii zależy od kwadratu poziomu sfosforylowanych dimerów p53 (z powodu równoczesnego przyłączania). W związku z tym w nieskończenie małym odcinku czasu Δt prawdopodobieństwo aktywacji genu $P^b(t, \Delta t)$ wynosi

$$P^b(t, \Delta t) = \Delta t (q_0 + q_1 P53_{np}^2(t)). \quad (6.3)$$

gdzie $P53_{np}$ oznacza ilość sfosforylowanych dimerów p53 w jądrze, a q_0 odpowiada pewnej bazowej produkcji transkryptu niezależnej od p53. Przyjęto, że prawdopodobieństwo dezaktywacji genów jest stałe i wynosi

$$P^d(t, \Delta t) = \Delta t q_2. \quad (6.4)$$

Gdy $P53_{np}(t)$ zmienia się wolno, prawdopodobieństwo tego, że gen znajduje się w stanie aktywnym wynosi w przybliżeniu P_A (dokładniej to wynosi ono P_A gdy $P53_{np}(t) = const$)

$$P_A(t) = \frac{q_0 + q_1 P53_{np}^2(t)}{q_2 + q_0 + q_1 P53_{np}^2(t)}. \quad (6.5)$$

Prawdopodobieństwo $P_A(t)$ może być interpretowane jako "wydajność transkrypcyjna p53". Gdy nie ma aktywnego p53, $P_A(t) = q_0/(q_2 + q_0)$, i geny transkrypcyjnie zależne od p53 są nieaktywne przez większość czasu. Gdy poziom aktywnego p53 jest bardzo wysoki, $P_A(t) \simeq 1$ i geny zależne od niego są aktywne przez większość czasu. Pomimo braku jakichkolwiek przesłanek, że q_0 , q_1 and q_2 są takie same dla wszystkich genów podległych p53 w celu redukcji ilości parametrów przyjęto, że są one takie same dla Mdm2 i PTEN.

Założono, że gdy allel jest w stanie aktywnym, to transkrypcja następuje z tempem s_0 dla genu Mdm2 i tempem s_1 dla genu PTEN. Prędkość polimerazy mRNA $\sim 40\text{nt/s}$ i charakterystyczna minimalna odległość pomiędzy sąsiednimi polimerazami równa 250 nt dają górny limit wydajności transkrypcyjnej pojedynczego allela $s_{\max} = 40/250 = 0.16$ [mRNA/s]. Podobnie górny limit wydajności translacji $t_{\max} = 0.5$ [protein/mRNA/s] [53].

Procesy uszkodzania i naprawy DNA

W modelu przyjęto, że w czasie naświetlania komórki ilość uszkodzeń DNA wzrasta, w taki sposób, że przy nieskończenie małym czasie Δt prawdopodobieństwo $P^{DAM}(t, \Delta t)$ pojawienia się nowego podwójnego pęknięcia nici DNA (DSB) wynosi:

$$P^{DAM}(t, \Delta t) = \Delta t d_{DAM} R. \quad (6.6)$$

gdzie R oznacza moc promieniowania, a $d_{DAM} = 35/\text{Gy}$ jest współczynnikiem uszkodzeń DNA. W rezultacie, przy zaniedbaniu procesu naprawy DNA w czasie fazy naświetlania liczba pojawiających się DSB przedstawia rozkład Poissona o średniej równej $35x$, gdzie x jest dawką przyjętego promieniowania w Gy.

W modelu nie zaimplementowano wprost żadnego mechanizmu naprawy DNA. Zamiast tego w związku z faktem, że p53 reguluje transkrypcję wielu genów naprawczych założono,

że tempo tej naprawy zależy od aktywności transkrypcyjnej p53 $P_A(t)$, danej równaniem (6.5).

Przy nieskończenie krótkim czasie Δt prawdopodobieństwo $P^{REP}(t, \Delta t)$, że liczba DSB ($N(t)$) zmniejszy się o jeden wynosi:

$$P^{REP}(t, \Delta t) = N(t) \frac{\Delta t d_{REP} P_A(t)}{N(t) + N_{SAT} P_A(t)}. \quad (6.7)$$

Taka forma P^{REP} oddaje również założenie, że jeżeli liczba DSB jest duża w stosunku do liczby kompleksów naprawczych, to muszą one czekać na kolejny wolny kompleks.

Czynniki apoptotyczne

Zaprezentowane powyżej mechanizmy powstawania i naprawy uszkodzeń DNA nie zapewniają jednoznaczności decyzji co do losu komórki. W celu jej zapewnienia wprowadzono do modelu czynniki apoptotyczne, których synteza zależna jest od poziomu aktywnego białka p53. Sama ścieżka apoptotyczna jest złożona i występują w niej trzy główne grupy genów pro-apoptotycznych regulowanych przez p53, które akumulują się odpowiednio w błonie komórkowej, w cytoplazmie i mitochondriach (przeгляд w [18] i [91]). Wiele molekuł może odgrywać rolę czynnika apoptotycznego, w niniejszej pracy nie będą one identyfikowane. Przyjęto, że poziom czynników apoptotycznych $A(t)$, jest dany równaniem:

$$\frac{d}{dt} A(t) = p_1 \frac{q_3 P53_{np}^2(t)}{q_4 + q_3 P53_{np}^2(t)} - d_9 A(t), \quad (6.8)$$

Dla uproszczenia modelu pominięto ich transkrypcję i założono, że są one produkowane w sposób deterministyczny regulowany poziomem aktywnego p53. Następnym założeniem jest fakt, że czynniki apoptotyczne działają poprzez cięcie nici DNA, prowadząc do pojawiania się kolejnych DSB. Wynika to z faktu, że jednym z etapów apoptozy jest cięcie DNA na niewielkie fragmenty. Przy tych założeniach w nieskończenie krótkim czasie Δt prawdopodobieństwo $P^{DAM}(t, \Delta t)$ pojawienia się nowego DSB wynosi:

$$P^{DAM}(t, \Delta t) = \Delta t d_{DAM} R + \Delta t a_6 \left(\frac{A(t)}{A_{\max}} \right)^4, \quad (6.9)$$

gdzie $A_{\max} = p_1/d_9$ jest maksymalnym poziomem czynników apoptotycznych wynikającym z równania (6.8), zaś a_6 jest miarą ich zdolności do uszkodzania DNA. Na poziomie pojedynczej komórki apoptoza jest decyzją *Tak* lub *Nie*, więc w powyższej zależności założono czwartą potęgę, która zapewnia, że przy niewielkim poziomie czynników apoptotycznych ich wpływ na ilość uszkodzeń DNA jest pomijalnie mały, zaś przy dużym jest on decydujący.

6.3 Równania

Oznaczenia zmiennych

- AKT_p - aktywna forma Akt
- MDM_t - transkrypt Mdm2
- MDM - cytoplazmatyczne Mdm2

- MDM_p - sfosforylowane cytoplazmatyczne Mdm2
- MDM_{pn} - sfosforylowane Mdm2 w jądrze
- $P53_n$ - nieaktywna forma dimerów p53 w jądrze
- $P53_{pn}$ - aktywna forma dimerów p53 w jądrze
- $PTEN_t$ - transkrypt PTEN
- $PTEN$ - (cytoplazmatyczny) PTEN
- PIP_p - aktywna forma PIP (PIP3)
- N - Liczba podwójnych pęknięć nici DNA (DSBs)
- R - natężenie promieniowania
- $G_M = G_{M1} + G_{M2}$ - stan genu Mdm2, $G_M \in \{0, 1, 2\}$
- $G_P = G_{P1} + G_{P2}$ - stan genu PTEN, $G_P \in \{0, 1, 2\}$

Parametry

Tabela 6.1. Parametry modelu układu regulatorowego p53|Mdm2

Parametr	Opis	Wartość
a_0	tempo spontanicznej aktywacji $P53_n$	$1 \times 10^{-4}/s$
a_1	tempo fosforylacji $P53_n$ wymuszone uszkodzeniem DNA	$1 \times 10^{-3}/s$
a_2	tempo aktywacji PIP	$5 \times 10^{-5}/s$
a_3	tempo aktywacji AKT	$2 \times 10^{-9}/s$
a_4	tempo fosforylacji MDM	$1 \times 10^{-8}/s$
c_0	tempo hydrolizacji PIP_p przez $PTEN$	$2.5 \times 10^{-9}/s$
c_1	tempo dezaktywacji AKT_p	$2 \times 10^{-4}/s$
c_2	tempo defosforylacji MDM_p	$1 \times 10^{-4}/s$
c_3	tempo spontanicznej defosforylacji $P53_{pn}$	0
d_0	tempo spontanicznej degradacji wszystkich form Mdm2	$3 \times 10^{-5}/s$
d_1	tempo deg. wszystkich form Mdm2 wymuszone uszk. DNA	$1.5 \times 10^{-4}/s$
d_2	tempo degradacji $PTEN$	$5 \times 10^{-5}/s$
d_3	tempo spontanicznej degradacji $P53_n$	$1 \times 10^{-4}/s$
d_4	tempo degradacji $P53_n$ wymuszonej przez MDM_{pn}	$1 \times 10^{-13}/s$
d_5	tempo spontanicznej degradacji $P53_{pn}$	$1 \times 10^{-4}/s$
d_6	tempo degradacji $P53_{pn}$ wymuszonej przez MDM_{pn}	$1 \times 10^{-14}/s$
d_7	tempo degradacji MDM_t	$3 \times 10^{-4}/s$
d_8	tempo degradacji $PTEN_t$	$3 \times 10^{-4}/s$
e_0	export MDM_{pn} z jądra komórkowego	0
i_0	import MDM_p do jądra komórkowego	$5 \times 10^{-4}/s$
p_0	tempo produkcji $P53_n$	$2 \times 10^2/s$
s_0	tempo transkrypcji MDM_t	$6 \times 10^{-2}/s$
s_1	tempo transkrypcji $PTEN_t$	$6 \times 10^{-2}/s$
t_0	tempo translacji MDM	$5 \times 10^{-1}/s$
t_1	tempo translacji $PTEN$	$1 \times 10^{-1}/s$
h_0	stała Michaelisa dla aktywacji $P53_n$ i degradacji wszystkich form Mdm2	7
q_0	tempo spontanicznej aktywacji genów Mdm2 i PTEN	$1 \times 10^{-4}/s$
q_1	tempo aktywacji genów Mdm2 i PTEN zależne od $P53_{pn}$	$5 \times 10^{-13}/s$
q_2	tempo dezaktywacji genów Mdm2 i PTEN	$3 \times 10^{-3}/s$
N_{SAT}	współczynnik nasycenia kompleksów naprawczych DNA	50
d_{DAM}	tempo uszkodzania DNA	35/Gy
d_{REP}	tempo naprawy DNA	$3 \times 10^{-3}/s$
AKT_{tot}	całkowita liczba białek Akt ($AKT + AKT_p$)	2×10^5
PIP_{tot}	całkowita liczba białek PIP ($PIP + PIP_p$)	1×10^5
a_6	maksymalne tempo uszk. DNA przez czynniki apoptotyczne	$1 \times 10^{-1}/s$
d_9	tempo degradacji czynników apoptotycznych	$1 \times 10^{-4}/s$
p_1	maksymalne tempo syntezy czynników apoptotycznych	$1 \times 10^2/s$
q_3	współczynnik syntezy czynników apoptotycznych	$8 \times 10^{-14}/s$
q_4	współczynnik syntezy czynników apoptotycznych	$3 \times 10^{-3}/s$

Cytoplazmatyczny PTEN, $PTEN$: Pierwszy człon opisuje syntezę $PTEN$, a drugi jego degradację

$$\frac{d}{dt}PTEN(t) = t_1 PTEN_t(t) - d_2 PTEN(t). \quad (6.10)$$

Aktywna forma PIP, PIP_p : Pierwszy człon opisuje aktywację PIP , podczas gdy drugi jego hydrolizację przez $PTEN$

$$\frac{d}{dt}PIP_p(t) = a_2 (PIP_{tot} - PIP_p(t)) - c_0 PTEN(t) PIP_p(t). \quad (6.11)$$

Aktywne białko Akt, AKT_p : Pierwszy człon opisuje aktywację AKT regulowaną przez PIP_p , człon drugi jego dezaktywację

$$\frac{d}{dt}AKT_p(t) = a_3 (AKT_{tot} - AKT_p(t)) PIP_p(t) - c_1 AKT_p(t). \quad (6.12)$$

Cytoplazmatyczne Mdm2, MDM : Pierwsze dwa człony opisują syntezę MDM i defosforylację MDM_p , człon trzeci opisuje fosforylację MDM regulowaną przez AKT_p , podczas gdy ostatni swobodną i wymuszoną uszkodzeniem DNA degradację MDM

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}MDM(t) = & t_0 MDM_t(t) + c_2 MDM_p(t) - a_4 MDM(t) AKT_p(t) \\ & - \left(d_0 + d_1 \frac{N^2(t)}{h_0^2 + N^2(t)} \right) MDM(t). \end{aligned} \quad (6.13)$$

Sfosforylowane Mdm2 w cytoplazmie, MDM_p : Pierwszy człon opisuje fosforylację MDM przy udziale AKT_p , drugi spontaniczną defosforylację MDM_p , następnie import i eksport z jądra komórkowego. Ostatni człon opisuje degradację MDM_p zarówno swobodną jak i wymuszoną przez uszkodzenie DNA

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}MDM_p(t) = & a_4 MDM(t) AKT_p(t) - c_2 MDM_p(t) \\ & - i_0 MDM_p(t) + e_0 MDM_{pn}(t) \\ & - \left(d_0 + d_1 \frac{N^2(t)}{h_0^2 + N^2(t)} \right) MDM_p(t). \end{aligned} \quad (6.14)$$

Sfosforylowane Mdm2 w jądrze, MDM_{pn} : Pierwsze dwa człony opisują import i export z jądra komórkowego, podczas gdy ostatni spontaniczną jak i wymuszoną przez uszkodzenie DNA degradację MDM_{pn}

$$\frac{d}{dt}MDM_{pn}(t) = i_0 MDM_p(t) - e_0 MDM_{pn}(t) - \left(d_0 + d_1 \frac{N^2(t)}{h_0^2 + N^2(t)} \right) MDM_{pn}(t). \quad (6.15)$$

Nieaktywne p53, $P53_n$: Pierwszy człon opisuje syntezę $P53_n$, następny aktywację spontaniczną jak i następującą wskutek uszkodzenia DNA, trzeci człon opisuje dezaktywację $P53_{pn}$, a ostatni degradację $P53_n$ zarówno spontaniczną jak i indukowaną przez MDM_{pn}

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}P53_n(t) &= p_0 - \left(a_0 + a_1 \frac{N^2(t)}{h_0^2 + N^2(t)} \right) P53_n(t) + c_3 P53_{pn}(t) \\ &\quad - \left(d_3 + d_4 MDM_{pn}^2(t) \right) P53_n(t). \end{aligned} \quad (6.16)$$

Aktywne p53, $P53_{pn}$: Pierwszy człon opisuje aktywację $P53_n$ zarówno swobodną jak i powstałą po uszkodzeniu DNA, drugi człon opisuje dezaktywację $P53_{pn}$, a ostatni jego degradację swobodną i indukowaną przez MDM_{pn}

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}P53_{pn}(t) &= \left(a_0 + a_1 \frac{N^2(t)}{h_0^2 + N^2(t)} \right) P53_n(t) - c_3 P53_{pn}(t) \\ &\quad - \left(d_5 + d_6 MDM_{pn}^2(t) \right) P53_{pn}(t). \end{aligned} \quad (6.17)$$

Transkrypt Mdm2, MDM_t : Pierwszy człon opisuje transkrypcję MDM_t podczas gdy drugi degradację

$$\frac{d}{dt}MDM_t(t) = s_0 (G_{M1} + G_{M2}) - d_7 MDM_t(t). \quad (6.18)$$

Transkrypt PTEN, $PTEN_t$: Pierwszy człon opisuje transkrypcję $PTEN_t$, a następny jego degradację

$$\frac{d}{dt}PTEN_t(t) = s_1 (G_{P1} + G_{P2}) - d_8 PTEN_t(t). \quad (6.19)$$

6.4 Przybliżenie deterministyczne

Jak zaprezentowano w części poświęconej wynikom symulacji, efekty stochastyczne występujące w badanej ścieżce sygnałowej, takie jak przełączenia genów oraz procesy uszkodzenia i naprawy DNA, mają zasadniczy wpływ na dynamikę komórki. Pomimo tego, jak pokazano w rozdziale trzecim, warto budować i analizować równocześnie z modelem stochastycznym jego przybliżenie deterministyczne. Przybliżenie deterministyczne powyższego modelu może być uzyskane przy założeniach, że:

1) Tempa aktywacji i dezaktywacji genów q_0 , q_1 i q_2 dążą do nieskończoności ze stałymi stosunkami równymi q_0/q_2 i q_1/q_2 . W granicy tempo transkrypcji mRNA z pojedynczej kopii genu wynosi $P_A(t)$ (jak w równaniu (6.5)) w związku z czym równania (6.18) i (6.19) mogą być zastąpione przez:

$$\frac{d}{dt} MDM_t(t) = 2s_0 P_A(t) - d_7 MDM_t(t). \quad (6.20)$$

$$\frac{d}{dt} PTEN_t(t) = 2s_1 P_A(t) - d_8 PTEN_t(t). \quad (6.21)$$

2) Liczba podwójnych uszkodzeń nici DNA $N(t)$ jest zmienną ciągłą daną następującą zależnością:

$$\frac{d}{dt} N(t) = d_{DAM} R - \frac{N(t) d_{REP} P_A(t)}{N(t) + N_{SAT} P_A(t)} + a_6 \left(\frac{A(t)}{A_{max}} \right)^4. \quad (6.22)$$

W rezultacie w przybliżeniu deterministycznym układ opisywany jest równaniami (6.10-6.17) i (6.20-6.22).

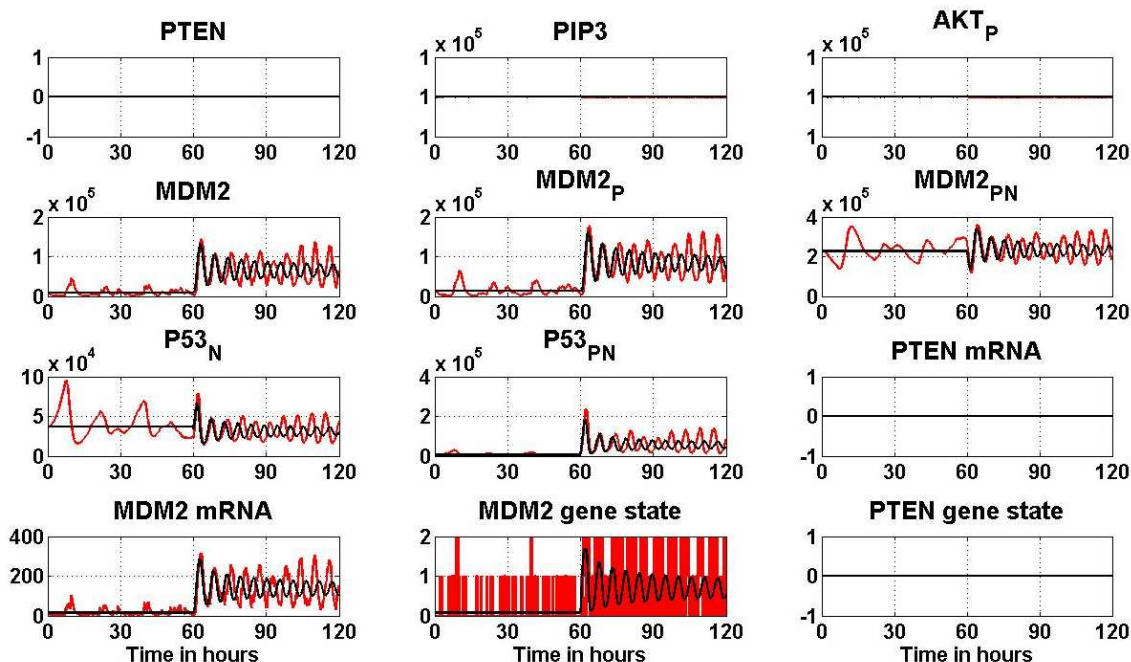
6.5 Rezultaty

Dynamika proponowanego modelu p53|Mdm2 charakteryzuje się posiadaniem dwóch stanów ustalonych oraz cyklu granicznego. Pierwszy stan ustalony występuje w przypadku braku pobudzenia (braku uszkodzenia DNA), gdy aktywne p53 znajduje się w swym niskim poziomie, zaś Mdm2 w jądrze w wysokim. W przypadku, gdy nastąpi przerwanie nici DNA i jednocześnie wyłączona jest jego naprawa jak i pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego, komórka znajdzie się w cyklu granicznym, w którym obserwujemy niegasnące oscylacje poziomów p53 i Mdm2. Jeżeli komórka zostanie pobudzona poprzez uszkodzenie DNA, które nie będzie naprawiane, a pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego nie zostanie zablokowana, to komórka przechodzi do swojego drugiego stanu ustalonego, w którym poziom aktywnego p53 jest wysoki, a poziom Mdm2 w jądrze niski. W sytuacji gdy zarówno naprawa DNA jak i dodatnie sprzężenie są włączone następuje pomiędzy nimi współzawodnictwo. Jeżeli naprawa jest wystarczająco wydajna, komórka wraca do stanu wyjściowego,

jeżeli nie, to po wystąpieniu kilku oscylacji przechodzi do drugiego stanu ustalonego. Powyższe przypadki opisano dokładniej poniżej.

PTEN wyłączony, naprawa DNA wyłączona: oscylacje

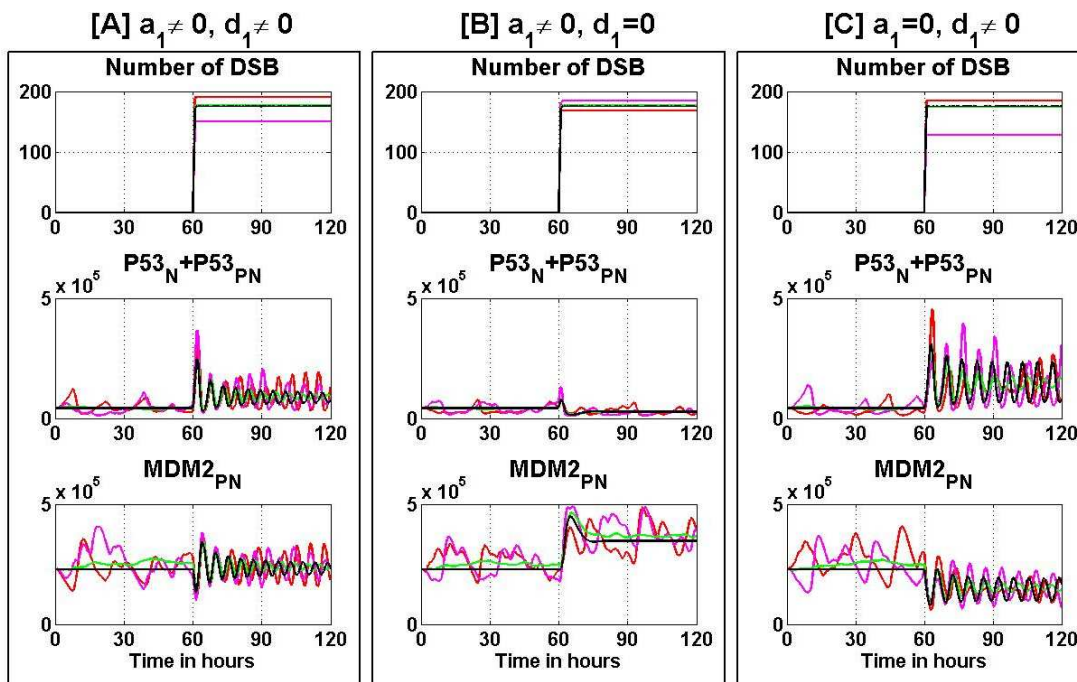
Wyłączenie pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego w rozumieniu biologicznym może następować, gdy któreś z białek w niej występujących nie jest produkowane bądź też zablokowana jest jego aktywacja. W pracy założono, że wyłączenie sprzężenia dodatniego następuje poprzez blokadę transkrypcji białka PTEN, a dokładniej poprzez zablokowanie aktywacji genu PTEN. Brak indukcji PTEN przez p53 w komórkach nowotworowych występuje na przykład w komórkach MCF-7 [94] i spowodowany jest metylacją jego promotora [23], [47]. Komórki MCF-7 zostały wykorzystane przez Bar-Or i in. w eksperymentach populacyjnych [3], a następnie przez Lahav i in. [49] i Geva-Zatorsky i in. [24] w eksperymentach na pojedynczych komórkach, które pokazują istnienie oscylacji w poziomach p53 i Mdm2 w jądrze komórkowym. W eksperymencie [24] (rysunek 2.2) komórki napromieniowane pomimo uszkodzenia DNA, nie tylko nie umierają, lecz oscylują przez 72h i dodatkowo proliferują. Sugeruje to, że uszkodzona jest w nich ścieżka blokady cyklu komórkowego jak również apoptotyczna oraz nie działają procesy naprawy DNA. Częściowo takie zachowanie może być spowodowane brakiem w MCF-7 kaspazy 3, która jest ważnym składnikiem ścieżki apoptotycznej. Jak pokazali Essmann i in. [17] reekspresja kaspazy 3 w badanych komórkach ponownie uruchamiała apoptozę zależną od napromieniowania.



Rysunek 6.4: Odpowiedź modelu stochastycznego (czerwony) i przybliżenia deterministycznego (czarny) na wymuszenie dawką 5 Gy w przypadku, gdy pętla dodatniego sprzężenia jak i naprawa DNA są wyłączone. W czasie przed wymuszeniem ($t < 60h$) układ znajduje się w stabilnym stanie ustalonym, w chwili $t = 60h$ na układ podano godzinny puls wymuszenia, następnie obserwowano układ przez kolejne 59 godzin.

W proponowanym modelu można zasymulować obserwowane w [24] zachowanie komórek wyłączając produkcję białka PTEN oraz procesy naprawy DNA. Na rysunku 6.4 zaprezentowano dynamikę przykładowej komórki modelu stochastycznego (czerwony) oraz przybliżenia deterministycznego (czarny) w odpowiedzi na wymuszenie dawką 5 Gy.

Obserwując odpowiedzi przybliżenia deterministycznego można zauważyć, że przed wystąpieniem promieniowania układ znajduje się w pierwszym stanie stabilnym charakteryzującym się niskim poziomem aktywnego p53 w jądrze komórkowym ($P53_{pn}$). Powstanie uszkodzenia DNA w odpowiedzi na promieniowanie powoduje wzrost tempa aktywacji p53 oraz degradacji Mdm2 w jądrze. Aktywne p53 jest dużo bardziej stabilne, więc prowadzi to do jego kumulacji w jądrze. Sfosforylowane p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym białka Mdm2. Nowo wyprodukowane i zaktywowane Mdm2 zostaje przetransportowane do jądra komórkowego, gdzie powoduje degradację p53. W rezultacie układ przechodzi do cyklu granicznego z okresem oscylacji około 5,5 godziny.



Rysunek 6.5: Przykładowe trajektorie stochastyczne (czerwony i różowy), deterministyczna (czarny) i średnia po 100 komórkach (zielony) w przypadku wyłączzonego PTEN i naprawy DNA. [A] Przypadek, gdy uszkodzenie DNA wpływa na fosforylację p53 i degradację Mdm2 ($a_1 \neq 0, d_1 \neq 0$). [B] Przypadek, gdy uszkodzenie DNA jedynie fosforyluje p53 ($a_1 \neq 0, d_1 = 0$). [C] Przypadek, gdy uszkodzenie DNA jedynie destabilizuje Mdm2 ($a_1 = 0, d_1 \neq 0$). Protokół symulacji jak dla rysunku 6.4

Dynamika modelu stochastycznego różni się od przybliżenia deterministycznego. Przeprowadzając symulację modelu stochastycznego przyjęliśmy, iż algorytm startuje ze stanu ustalonego dla przybliżenia deterministycznego. Przed powstaniem uszkodzenia DNA poziomy białek wykazują znaczne, nieregularne wahania podobne do tych obserwowanych w eksperymencie [24]. Przyczyną powstawania tych nieregularnych fluktuacji jest stochastyczna aktywacja genów. Po uszkodzeniu DNA oscylacje stają się regularne, o dobrze zachowanym okresie i zróżnicowanej amplitudzie. W tym przedziale czasu również widać

wpływ stochastycznej aktywacji genu Mdm2, jednakże oscylacje są bardziej regularne, co sugeruje, iż cykl graniczny jest silniejszym atraktorem niż punkt stały. Różnica pomiędzy czysto stochastycznymi, a wymuszonymi wahaniami poziomów p53 i Mdm2 jest lepiej uwidocznioma na rysunku 6.5a. Poziomy średnie (zielony) uzyskane ze 100 komórek prawie nie oscylują przed powstaniem uszkodzenia DNA, choć pojedyncze komórki doznają sporych fluktuacji (czerwony i różowy). Brak oscylacji dla średniej spowodowany jest rozsynchronizowaniem pojedynczych komórek w tym przedziale, a co za tym idzie zniesieniem się poszczególnych faz przy sumowaniu. Po wystąpieniu uszkodzenia DNA, oscylacje te pojawiają się ze stałym okresem, jednakże ich amplituda wolno zmierza do zera, co także wynika z rozsynchronizowania pojedynczych komórek. Powyższa analiza pokazuje, że przybliżenie deterministyczne może nie oddawać prawidłowo dynamiki pojedynczej komórki ani średniej z populacji.

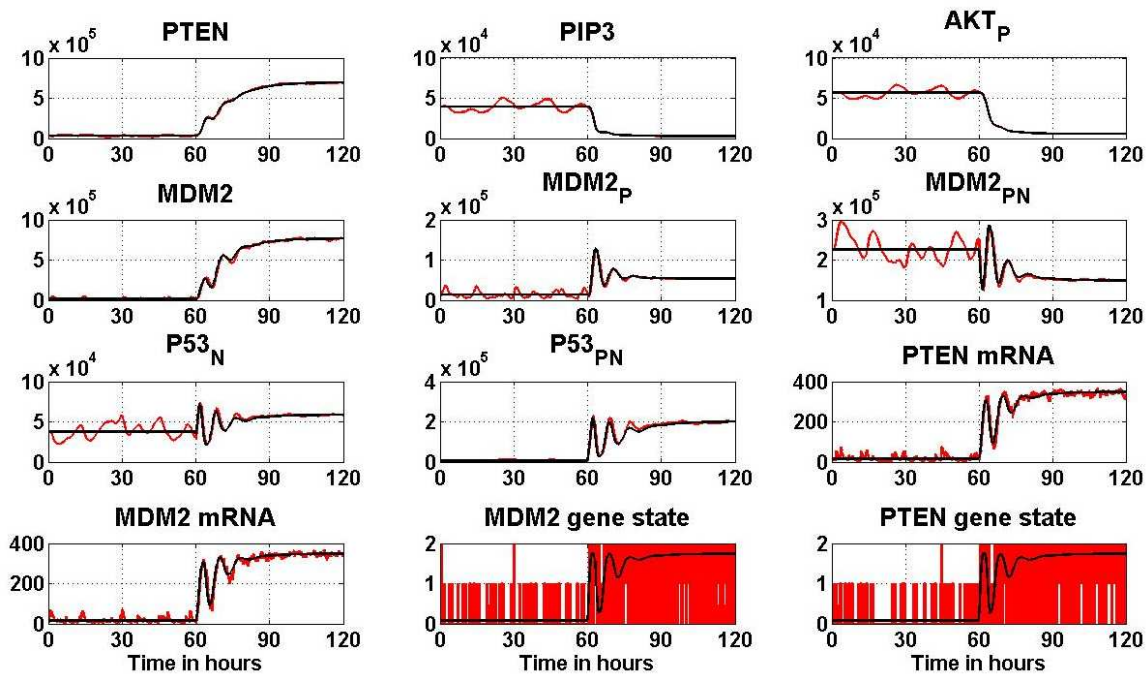
Uszkodzenie DNA pobudza moduł regulatorowy p53|Mdm2 na dwa sposoby: poprzez destabilizację Mdm2 i aktywację p53. Dokonano analizy zachowania się komórki w przypadku wpływu uszkodzenia DNA na tylko jedną z możliwych dróg aktywacji. W przypadku gdy uszkodzenie DNA jedynie fosforyluje p53 (rysunek 6.5b) nie wpływając na Mdm2 ($d_1 = 0$) nie następuje wzbudzenie oscylacji p53|Mdm2 i poziom p53 pozostaje niski. Rezultat ten jest zgodny z wynikami eksperymentalnymi [85] i [86], które pokazują, że zablokowanie destabilizacji Mdm2 w komórkach z uszkodzonym DNA zapobiega aktywacji genów zależnych transkrypcyjnie od p53. Zablokowanie aktywacji p53 nie przeszkadza w powstawaniu oscylacji (rysunek 6.5c).

PTEN załączony, naprawa DNA wyłączona: apoptoza

W przypadku drugim mamy do czynienia z sytuacją, gdy produkcja PTEN, a co za tym idzie pętla dodatniego sprzężenia jest niezaburzona, nadal jednak zablokowane pozostają procesy naprawy DNA. Jak pokazano na rysunku 6.6 uszkodzenie DNA aktywuje białko p53, które rozpoczyna proces transkrypcji fosfatazy PTEN. Ta kumulując się w cytoplazmie hydrolizuje PIP3 zmieniając go w PIP2, który nie jest w stanie aktywować białka Akt. W rezultacie poziom aktywnego Akt spada powodując znaczny spadek tempa aktywacji Mdm2, które zamiast fosforylacji i przenikania do jądra komórkowego ulega degradacji w cytoplazmie. Brak aktywnego Mdm2 przy jednoczesnym ustabilizowaniu p53 przez istniejące uszkodzenie DNA prowadzi do znacznego wzrostu jego ilości w jądrze komórkowym. Sprzężenie to jest zatem dodatnie w tym sensie, że blokuje działanie pętli ujemnego sprzężenia. W efekcie końcowym układ przechodzi do drugiego stanu ustalonego, charakteryzującego się wysokim poziomem aktywnego p53 i niskim Mdm2 w jądrze.

Takie zachowanie się modelu ma swoje odbicie w pracach Mayo i jego zespołu [60]. Pokazują oni, że nadekspresja PTEN blokuje aktywację Mdm2, uniemożliwiając jego przenikanie do jądra. W komórkach nowotworowych U87MG, w których gen PTEN jest zablokowany, Mdm2 znajduje się głównie w jądrze komórkowym. W komórkach U87MG(PTEN +/+), w których dokonano transfekcji PTEN, Mdm2 przeważa w cytoplazmie. Praca [60] pokazuje również, że PTEN zwiększa ekspresję genów zależnych transkrypcyjnie od p53 i że w komórkach, w których dokonano jego transfekcji obserwowano wyższy poziom Mdm2 niż w komórkach bez PTEN. W kolejnej pracy [59] Mayo i Donner pokazują, że ekspresja aktywnego białka Akt pociąga za sobą export Mdm2 do jądra komórkowego, obniża poziom p53 jak również jego aktywność transkrypcyjną.

Osiągany przez układ w tym przypadku drugi stan ustalony z wysokim poziomem p53 jest interpretowany jako stan, w którym następuje inicjalizacja procesów apoptotycznych.



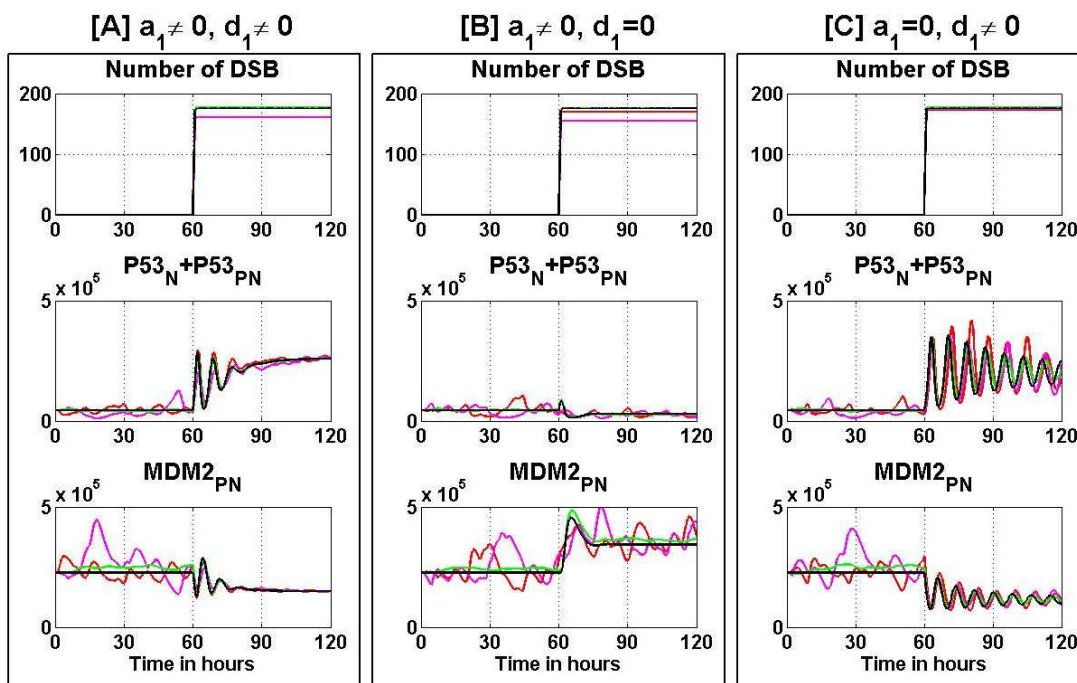
Rysunek 6.6: Odpowiedź modelu stochastycznego (czerwony) i przybliżenia deterministycznego (czarny) na wymuszenie dawką 5 Gy w przypadku z załączonym sprzężeniem dodatnim i wyłączoną naprawą DNA. W czasie przed wymuszeniem ($t < 60h$) układ znajduje się w stabilnym stanie ustalonym, w chwili $t = 60h$ na układ podano godzinny puls wymuszenia, następnie obserwowano układ przez kolejne 59 godzin.

Interpretacja ta oparta jest na publikowanych między innymi przez zespół Gottlieba jak i przez Voudsena i Lane wynikach eksperymentalnych, które pokazują, iż w komórkach zdolnych do apoptozy aktywacja ścieżek sygnałowych zależnych od p53 prowadzi do obniżenia poziomu białka Akt skutkującego znacznym podniesieniem poziomu p53 [27], [91].

Wolna kumulacja PTEN w komórkach poddanych napromienieniu jak również złożoność pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego powodują powstanie opóźnienia w jej działaniu. Przed osiągnięciem stanu apoptotycznego układ doznaje dwóch wyraźnie widocznych oscylacji (rysunek 6.6 i 6.7a). W komórkach nowotworowych jelita grubego (EB1) szczytowy poziom PTEN obserwowany jest 20-24 godziny po indukcji p53 [83], podczas gdy w unieśmiertelionych komórkach mysich fibroblastów poziom PTEN wzrasta 3-4 krotnie 16 godzin po napromienianiu dawką 10 Gy [84]. Opóźnienie w działaniu pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego daje kompleksom naprawczym czas przed podjęciem decyzji o apoptozie.

Podobnie jak w przypadku poprzednim sprawdzono, która z dwóch dróg aktywacji modułu regulatorowego p53|Mdm2 jest kluczowa dla przejścia komórki w stan apoptotyczny. W przypadku gdy uszkodzenie DNA odpowiada tylko za aktywację p53 nie destabilizując Mdm2 ($d_1 = 0$) w układzie nie występują oscylacje i poziom p53 pozostaje niski (rysunek 6.7b). W przypadku gdy uszkodzenie DNA nie prowadzi do aktywacji p53 ($a_1 = 0$), a jedynie zwiększa tempo degradacji Mdm2 w komórce mamy do czynienia z oscylacjami i p53 również nie osiąga swojego stanu wysokiego (rysunek 6.7c). Powyższa analiza pokazuje, że aby komórka mogła przejść w stan apoptotyczny konieczna jest nie zablokowana pętla

dotadniego sprzężenia jak również pobudzenie układu zarówno poprzez aktywację p53 jak i destabilizację Mdm2.

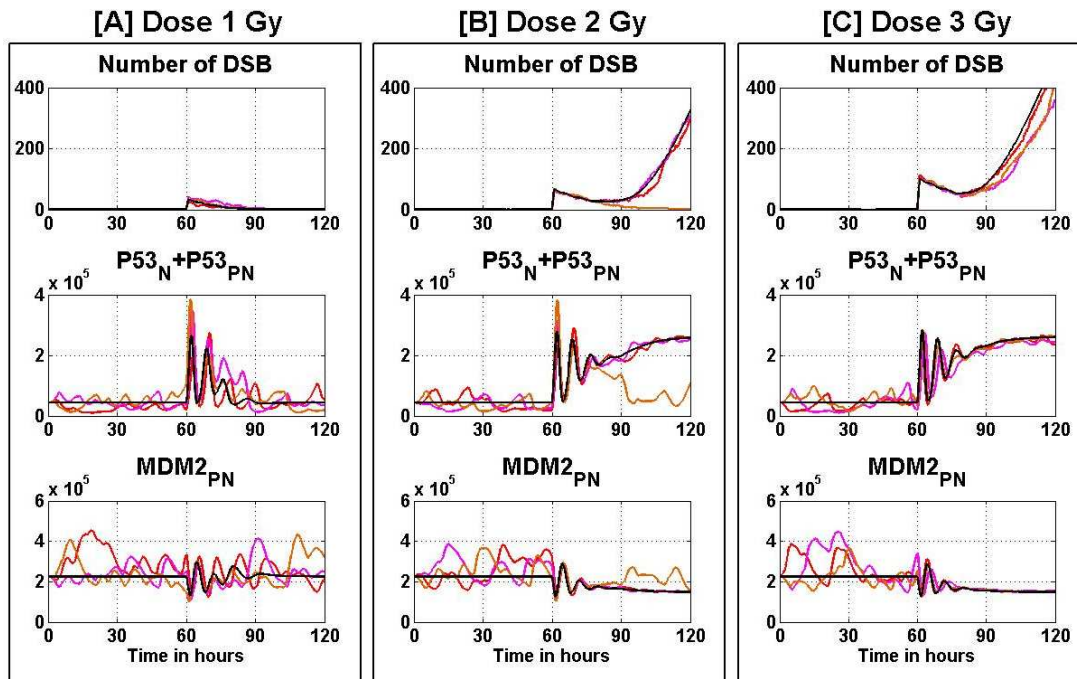


Rysunek 6.7: Trajektorie stochastyczne (czerwony i różowy), deterministyczna (czarny) i średnia po 100 komórkach (zielony) w przypadku włączonego PTEN i wyłączonej naprawy DNA. [A] Przypadek gdy uszkodzenie DNA wpływa i na fosforylację p53 i na degradację Mdm2 ($a_1 \neq 0, d_1 \neq 0$). [B] Przypadek gdy uszkodzenie DNA jedynie fosforyluje p53 ($a_1 \neq 0, d_1 = 0$). [C] Przypadek gdy uszkodzenie DNA jedynie destabilizuje Mdm2 ($a_1 = 0, d_1 \neq 0$). Protokół symulacji jak dla rysunku 6.6

PTEN załączony, naprawa DNA załączona: współzawodnictwo

Trzeci z badanych przypadków jest najbardziej zbliżony w swych założeniach do sytuacji w normalnych komórkach nienowotworowych. W momencie gdy zarówno pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego jak i naprawa DNA są niezaburzone mamy do czynienia z występującym między nimi współzawodnictwem. Uszkodzenie DNA powoduje degradację Mdm2 i jednoczesną stabilizację p53. Oba te działania prowadzą do zwiększenia się liczby aktywnego p53 w jądrze komórkowym. Aktywne p53 jest czynnikiem transkrypcyjnym dla wielu genów zaangażowanych w procesy naprawy DNA, które nie są w modelu ujęte bezpośrednio. Założono jednak, iż tempo naprawy DNA zależy od poziomu aktywnego białka p53, wyższy poziom oznacza szybszą naprawę. Aktywne p53 inicjuje również produkcję i kumulację się białka PTEN oraz powstawanie czynników apoptotycznych (na przykład kaspaz). Aktywowana przez PTEN pętla dodatniego sprzężenia prowadzi do zwiększenia się poziomu p53, w tym samym czasie następuje kumulacja czynników apoptotycznych, które po przekroczeniu poziomu progowego zaczynają szybko uszkadzać DNA. Istnienie w modelu czynników apoptotycznych powoduje, że decyzja o popełnieniu apoptozy jest nieodwracalna. W momencie gdy na skutek oddziaływania pętli dodatniego sprzężenia

zwrotnego p53 osiągnie swój poziom wysoki, poziom czynników apoptotycznych przekracza próg i komórka umiera. Brak czynników apoptotycznych powoduje, iż DNA zawsze zostaje naprawione, zaś dawka promieniowania, a co za tym wielkość uszkodzeń mają wpływ jedynie na czas naprawy.

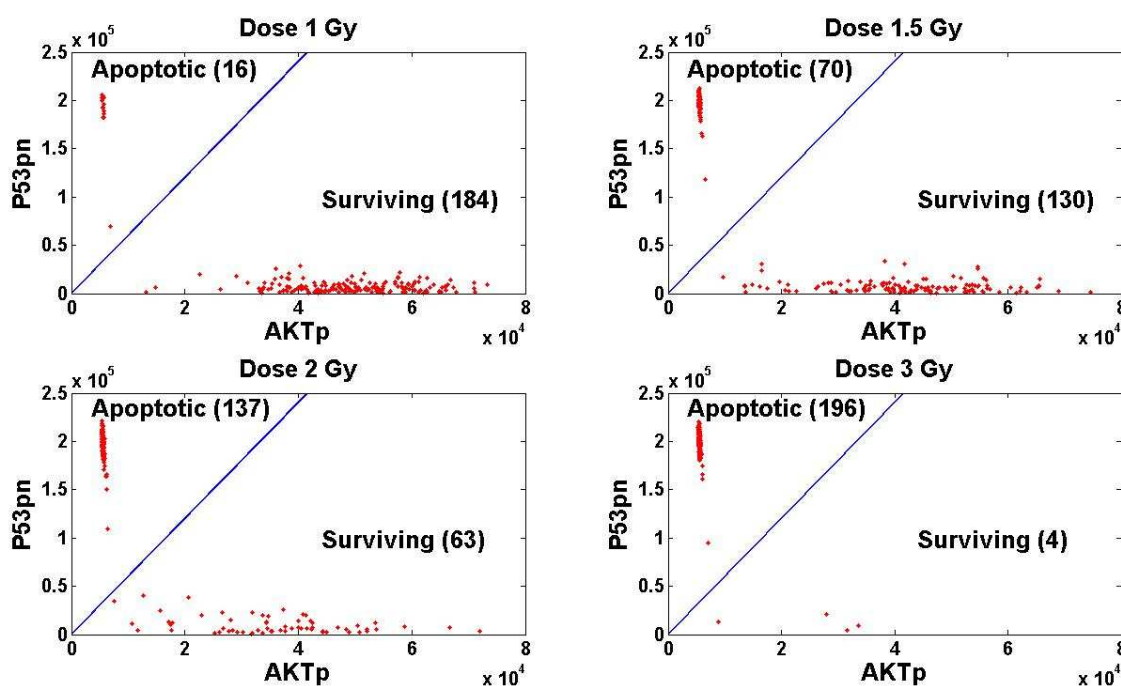


Rysunek 6.8: Odpowiedź deterministyczna (czarny) i przykładowe trzy stochastyczne (czerwony, różowy i brązowy) na wymuszenie dawką 5 Gy w przypadku z załączoną pętlą dodatniego sprzężenia i załączoną naprawą DNA. W czasie przed wymuszeniem ($t < 60h$) układ znajduje się w stabilnym stanie ustalonym, w chwili $t = 60h$ na układ podano godzinny puls wymuszenia, następnie obserwowano układ przez kolejne 59 godzin.

Mała dawka promieniowania powoduje powstanie niewielkiej ilości uszkodzeń DNA, które mogą być szybko naprawione (rysunek 6.8a). Duża dawka promieniowania prowadzi do rozległych uszkodzeń. W związku z ograniczoną liczbą kompleksów naprawczych (oddawanych w modelu parametrem N_{SAT}) nie wszystkie uszkodzenia zdążą być naprawione zanim nie uaktywni się pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego (rysunek 6.8c). W przybliżeniu deterministycznym graniczną dawkę promieniowania, powyżej której komórka ulega apoptozie, stanowi 1,88 Gy. Poniżej tej dawki DNA zostaje naprawione i komórka wraca do swego pierwszego stanu stabilnego. W prawdziwych komórkach jak i w modelu stochastycznym dawka promieniowania określa jedynie prawdopodobieństwo przejścia komórki w stan apoptotyczny, które wynosi mniej niż 0.1 dla dawki mniejszej niż 1 Gy i powyżej 0.9 dla dawki większej niż 3 Gy. Stochastyczność decyzji o popełnieniu apoptozy wynika zarówno ze stochastyczności procesów uszkodzania i naprawy DNA, gdzie dawka promieniowania określa prawdopodobieństwo powstania jednego uszkodzenia, zaś poziom p53 w danej chwili prawdopodobieństwo naprawienia jednego uszkodzenia jak również ze stochastycznej regulacji genów Mdm2 i PTEN. W modelu stochastycznym pojedyncze komórki wystawione na to samo wymuszenie mogą doznawać różnej wielkości uszkodzenia DNA jak również różnić się w nich może tempo naprawy DNA i tempo aktywacji dodatniego

sprzężenia.

Na rysunku 6.8 zaprezentowano zachowanie się trzech komórek stochastycznych (czerwony, różowy i brązowy) oraz przybliżenia deterministycznego w zależności od dawki promieniowania. Badania przeprowadzono dla 1, 2 i 3 Gy. Dla dawki 2 Gy, która jest nieznacznie większa od dawki krytycznej w przybliżeniu deterministycznym, dwie spośród trzech komórek pokazują gwałtowny wzrost liczby uszkodzeń DNA po pewnym czasie, co jest odpowiednikiem apoptozy. Trzecia komórka naprawia swe DNA i przeżywa.



Rysunek 6.9: Przewidywania modelu co do decyzji apoptotycznej 200 komórek w zależności od dawki promieniowania. Poziomy Akt i p53 zbierane w 48h po naświetleniu.

Bazując na powyższych obserwacjach można przyjąć jako wyznacznik procesów apoptotycznych wysoki poziom białka p53 oraz niski poziom białka Akt. Należy przy tym pamiętać, iż w komórce biologicznej proces cięcia DNA przez czynniki apoptotyczne zatrzymuje procesy transkrypcji czego model nie uwzględnia. Z uwagi na to ograniczenie, analiza procesu apoptozy na podstawie wysokiego poziomu p53 jest właściwe jedynie dla wczesnego jej stadium. Uwzględniając powyższe ograniczenia zbadano wpływ wielkości wymuszenia w postaci promieniowania jonizującego IR na wielkość frakcji komórek apoptotycznych (rysunek 6.9). Dla dawki 0.5 Gy wszystkie 200 komórek zdołało naprawić uszkodzenia i przeżyło. Dla dawki 4 Gy wszystkie 200 badanych komórek uległo apoptozie. Dla dawek pokazanych na rysunku widać wyraźnie, iż wzrost sygnału wymuszającego powoduje zwiększenie się frakcji komórek apoptotycznych, co jest w zgodzie z wiedzą biologiczną.

Rozdział 7

Model łączny systemów NF- κ B i p53

7.1 Streszczenie

Istnieje wiele przesłanek świadczących o współdziałaniu i jednoczesnej rywalizacji szlaków sygnałowych NF- κ B/I κ B α i p53/Mdm2 w określeniu odpowiedzi komórki na zaistniałe wymuszenie w postaci infekcji, uszkodzenia DNA czy sygnału propagowanego przez ligand TNF α . Szlak sygnałowy NF- κ B jest szlakiem wczesnej odpowiedzi immunologicznej kojarzonym z przeżyciem. Ścieżka p53 szlakiem odpowiedzi na uszkodzenie genomu regulującym między innymi wstrzymanie cyklu komórkowego, procesy naprawy DNA czy apoptozy. Interesującym jest zbadanie i poznanie ich wspólnych relacji. Współdziałanie wspomnianych modułów regulatorowych prowadzić może do jednoznacznego określenia przeznaczenia komórki w przypadku zaistnienia zagrożenia, przy czym przeznaczenie to może przyjmować tak skrajne przypadki jak dalsza proliferacja lub śmierć.

Rozdział siódmy poświęcony jest zaproponowanemu w ramach rozprawy modelowi łączącemu ścieżki sygnałowe NF- κ B i p53. Według najlepszej wiedzy autora jest to pierwsze podejście do powyższego problemu. Pomimo, iż zidentyfikowano doświadczalnie kilka możliwych połączeń i ich opis znajduje się w literaturze, to brak w niej dotychczas próby stworzenia modelu oddającego dynamikę takiego układu. Zbudowany w ramach pracy doktorskiej model zachowuje się zgodnie z wiedzą biologiczną dostępną w literaturze. Przy jego pomocy zaproponowano mechanizm pro- i anty-apoptotycznego działania NF- κ B, którego rola w komórce zależy od protokołu eksperymentu. Opracowany model może służyć pomocą przy planowaniu bądź interpretacji eksperymentów biologicznych przeprowadzanych między innymi przez współpracujący z jednostką macierzystą autora Instytut Onkologii w Gliwicach.

Drugi podrozdział rozdziału siódmego omawia istniejące w literaturze informacje o możliwych połączeniach modułów NF- κ B i p53. Trzeci prezentuje strukturę zaproponowanego modelu z uwzględnieniem wiedzy biologicznej, na której oparto kolejne komponenty. Kolejne dwa podrozdziały zawierają opis parametrów i równań modelu stochastycznego jak również jego przybliżenia deterministycznego. Podrozdział szósty prezentuje uzyskane w trakcie symulacji rezultaty podczas gdy ostatni jest podsumowaniem rozdziału siódmego.

7.2 Znane połączenia ścieżek NF- κ B|I κ B α i p53|Mdm2

Istnieje kilka modeli ścieżki sygnałowej NF- κ B wymienionych w rozdziale czwartym oraz modułu regulatorowego p53|Mdm2 przedstawionych w rozdziale piątym i szóstym. Zgodnie z wiedzą autora brak jest w chwili obecnej modeli łączących powyższe szlaki sygnałowe, a prezentowany w rozdziale siódmym układ jest pierwszym podejściem do zbudowania takiego modelu. W związku z powyższym w odróżnieniu od poprzednich rozdziałów nie opisano gotowych rozwiązań przedstawiając jedynie możliwe połączenia pomiędzy dwoma modułami z wyróżnieniem połączeń wybranych do budowy modelu łącznego.

W literaturze spotkać można wiele dowodów na to, iż ścieżki sygnałowe NF- κ B i p53 wspólnie kontrolują odpowiedź komórki na stres, w tym zatrzymanie cyklu komórkowego i procesy apoptotyczne. W ostatnich latach zidentyfikowano wiele wzajemnych ścieżek oddziaływań pomiędzy tymi dwoma modułami regulatorowymi. Ich przegląd znaleźć można w [74] i [75]. Najważniejsze z nich omówiono poniżej:

NF- κ B jest czynnikiem transkrypcyjnym p53

Wu i Lozano w [103] pokazują na przykładzie komórek HeLa, iż pojawienie się aktywnego NF- κ B na skutek działania TNF α powoduje 3-7 krotne zwiększenie się poziomu p53. Poprzez eksperyment transfekcyjny dowodzą oni, iż białko p65 kompleksu NF- κ B może przyłączać się do promotora p53 i powodować jego aktywację. Sprzężenie to zostało wykorzystane przy budowie modelu łącznego.

Aktywne NF- κ B jest niezbędne do apoptozy zależnej od p53

Ryan ze współpracownikami wykazali w [80], że pobudzenie p53 powoduje aktywację NF- κ B przy jednoczesnej zdolności p53 do rozpoczęcia procesu apoptozy. Zablokowanie produkcji NF- κ B bądź jego aktywacji blokuje możliwość wywołania apoptozy p53-zależnej. Autorzy pokazują jednocześnie, iż aktywacja NF- κ B przy pomocy p53 przebiega inaczej niż przy pobudzeniu przez TNF α i wymaga zaangażowania białka MEK1 i pp90^{rk}.

p53 hamuje tempo transkrypcji genów zależnych od NF- κ B

Badając komórki raka jelita DLD-1 Bartke ze swoim zespołem wykazali, iż białko p53 zwiększa poziom inhibitora receptorów śmierci - cFLIP oraz indukuje apoptozę niezależną od kaspazy 8 [4]. Zauważają oni również, że translokacja NF- κ B zmierzona przez analizę EMSA w szerokim spektrum wymuszenia TNF α nie jest zakłócana poprzez p53, podczas gdy transkrypcja genu wskaźnikowego zależnego od NF- κ B znacząco się zmniejsza. Gdy na komórkach DLD-1 posiadających zmutowany, nieaktywny gen p53 dokonano transfekcji nieuszkodzonego p53 (tak zwane wild type) transkrypcja genu wskaźnikowego po zadziałaniu dawką 2 lub 20 ng/ml TNF α zmniejszyła się czterokrotnie w stosunku do poziomu uzyskanego przy transfekcji zmutowanym p53. Osłabianie transkrypcji genów NF- κ B-zależnych przez aktywne p53 jest drugim sprzężeniem wykorzystanym w budowie modelu łącznego.

NF- κ B może być aktywowane przez p53

Oprócz wspomnianej w rozdziale czwartym drogi aktywacji NF- κ B przez TNF α , co powoduje degradację I κ B α przez IKK, Bohuslav z współpracownikami pokazują [8] inną ścieżkę jego uaktywnienia. Zgodnie z uzyskanymi przez autorów wynikami p53 aktywuje

kinazę RSK1, która z kolei fosforyluje białko p65 kompleksu NF- κ B. Fosforylacja ta znacząco zmniejsza powinowactwo NF- κ B i jego inhibitora I κ B α . Dzięki temu oba białka nie tworzą kompleksu w jądrze komórkowym, a tym samym NF- κ B nie jest z niego usuwane, co wzmacnia jego działanie jako czynnika transkrypcyjnego.

NF- κ B zwiększa ekspresję p53, jego stabilność oraz powinowactwo do nici DNA

Fujioka i in. w [22] przedstawiają dowody na to, że pro-apoptotyczna działalność NF- κ B może wynikać z faktu, iż jego aktywacja prowadzi do zwiększenia się poziomu ekspresji p53, ustabilizowania go w jądrze i zwiększenia jego powinowactwa do DNA. Tym samym wzrost aktywności NF- κ B powoduje zwiększenie się produkcji genów zależnych transkrypcyjnie od p53 w tym genów odpowiedzialnych za proces apoptozy jak PUMA i p21^{waf1}.

Tax hamuje aktywność p53 przy udziale NF- κ B

Kolejne możliwe sprzężenie ścieżek NF- κ B i p53 wynika z opisanego przez Jeonga i in. w [38] zjawiska polegającego na hamowaniu aktywności p53 przez Tax. Jeong i in. pokazują, że proces ten oparty o fosforylację białko p65 kompleksu NF- κ B wymaga obecności w komórce kinazy IKK β . Co ciekawe hamowanie aktywności p53 tą drogą nie wymaga aktywności transkrypcyjnej NF- κ B.

p53 zwiększa stałą wiązania NF- κ B do nici DNA hamując jednocześnie jego zdolności transkrypcyjne

Następny po [4] dowód na istnienie sprzężenia wykorzystanego w rozprawie, prezentowany jest przez Kawauchi z współpracownikami w [42]. Pokazują oni wyniki eksperymentów sugerujące, iż p53 zwiększa poziom acetylacji i fosforylacji Ser 536 cząsteczki p65 zwiększając tym samym jego stałą wiązania do nici DNA. Jednocześnie obserwują oni zmniejszenie się zdolności transkrypcyjnych tak przyzcpionego NF- κ B. Na podstawie swych obserwacji wnioskuje, iż osłabienie to wynika z hamowania przez p53 funkcji IKK oraz kinazy H3 koniecznej dla procesu transkrypcji.

NF- κ B i p53 blokują wzajemnie swoje działanie transkrypcyjne współzawodnicząc o współ-aktywator CBP

Wadgaonkar i in. w [93] oraz Webster i Perkins w [96] wykazali, iż zarówno NF- κ B jak i p53 do osiągnięcia swej optymalnej wydajności transkrypcyjnej potrzebują współ-aktywatorów będących kompleksami p300 i CBP. Kompleksów tych jest w komórce ograniczona ilość, więc pomiędzy czynnikami transkrypcyjnymi występuje rywalizacja i wygrana jednego z nich oznacza zwiększenie aktywności czynnika zwycięskiego i jej zmniejszenie u przegranego.

Fosforylacja CBP przez IKK α zmienia jego preferencje reakcyjne z p53 na NF- κ B

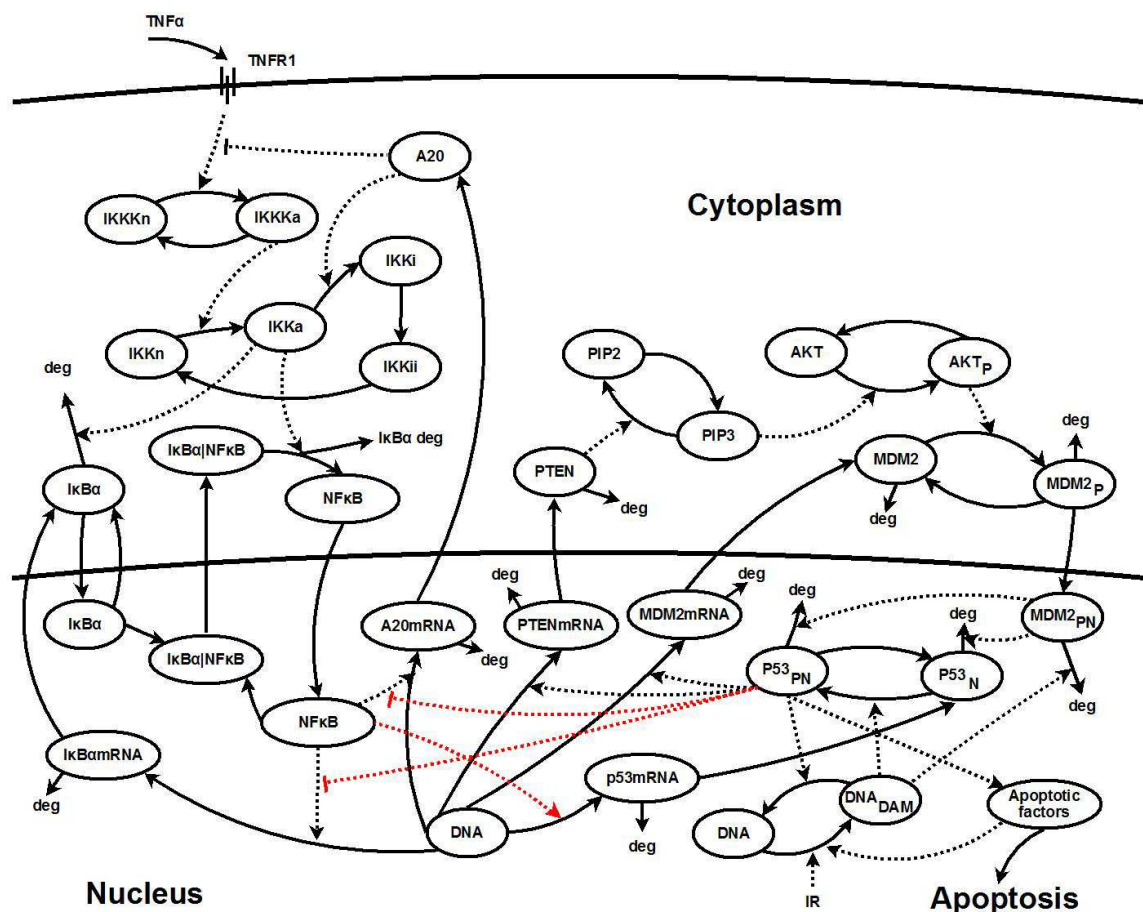
Jak pokazują Huang i in. [35] w trakcie rywalizacji opisanej powyżej CBP preferuje przyłączanie się do p53, jednakże fosforylacja seryny 1382 i 1386 CBP przez IKK α zmienia te preferencje powodując, iż CBP częściej przyłącza się do NF- κ B.

Oprócz powyższych powiązań, TNF α znany jest z regulowania innych ścieżek zarówno

pro- jak i anti-apoptotycznych, czego przegląd znaleźć można w [39]. W niniejszej pracy założono, że $\text{TNF}\alpha$ jest jedynie aktywatorem ścieżki sygnałowej NF- κ B i jego pozostałe oddziaływania są pomijane, to jest są one niwelowane przez inne czynniki.

7.3 Struktura modelu

Prezentowany w ramach niniejszej rozprawy model łączny sieci NF- κ B i p53 opisany w [77] powstał poprzez połączenie modelu NF- κ B zbudowanego przez Lipniackiego z współpracownikami [56] i prezentowanego w rozdziale czwartym oraz p53 zaprezentowanego w rozdziale szóstym. Zgodnie z wiedzą autora jest to pierwsze podejście do stworzenia spójnego modelu matematycznego tych ścieżek sygnałowych, mogącego oddawać dynamikę ich wzajemnego oddziaływania. Nowopowstały model łączny bazuje na już omówionych modelach, więc elementy niezmienione w stosunku do wersji rozdzielnych zostaną omówione skrótowo, zaś elementy nowe czy też te, które uległy zmianie nieco szerzej.



Rysunek 7.1: Model łączący moduły NF- κ B i p53. Kolorem czerwonym oznaczono nowo wprowadzone sprzężenia. Linie ciągłe oznaczają przejścia białek w kolejne formy, linie przerywane oddziaływania pozytywne w przypadku zakończenia strzałką i negatywne w przypadku zakończenia pionową kreską.

Struktura modelu widoczna jest na rysunku 7.1. Linie ciągle oznaczają transformację na przykład pomiędzy formą aktywną i nieaktywną danego białka, zaś linie przerywane oddziaływania. Strzałki sygnalizują działanie dodatnie (na przykład przyspieszanie aktywacji), zaś zakończenia linia prostopadłą działania ujemne (na przykład hamowanie aktywacji). Dodatkowo kolorem czerwonym zaznaczono nowe oddziaływania będące elementami łączącymi oba modele.

Układ może być aktywowany dwoma sygnałami: stężeniem $\text{TNF}\alpha$ na zewnątrz komórki oraz powstaniem uszkodzenia DNA na skutek promieniowania IR. W skrócie działanie układu można opisać następująco: w wyniku pojawienia się $\text{TNF}\alpha$ następuje aktywacja receptorów TNFR1 , które poprzez aktywację kinazy IKKK , a dalej IKK powodują degradację $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ i tym samym uwolnienie czynnika transkrypcyjnego $\text{NF-}\kappa\text{B}$, który po przedostaniu się do jądra aktywuje geny $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, A20 i p53 . $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ będące inhibitorem $\text{NF-}\kappa\text{B}$ po translacji wraca do jądra komórkowego i wyciąga czynnik transkrypcyjny do cytoplazmy. Działanie to stabilizowane jest poprzez białko A20 , które blokuje aktywację IKKK przez receptory z jednej strony i dezaktywuje aktywne białko IKK z drugiej.

Pojawiające się na skutek promieniowania uszkodzenie DNA powoduje przyśpieszenie degradacji białka Mdm2 będącego inhibitorem p53 oraz zwiększenie stabilności samego p53 poprzez jego fosforylację. Aktywne p53 odgrywa rolę czynnika transkrypcyjnego dla wielu białek, między innymi dla swego inhibitora Mdm2 , białka PTEN oraz białek biorących udział w naprawie uszkodzonego DNA. PTEN dezaktywując PIP3 prowadzi do dezaktywacji białka Akt , co z kolei blokuje aktywację nowopowstałego Mdm2 uniemożliwiając jego import do jądra komórkowego i tym samym blokując jego działanie jako inhibitora. W efekcie p53 osiąga stan wysoki. Sprzężenie dodatnie działa w dłuższej skali czasu niż sprzężenie ujemne i pełni rolę zegara dając komórce określony czas na naprawę uszkodzenia. Gdy uszkodzenie jest niemożliwe do naprawy bądź jego naprawa zajmuje zbyt dużo czasu p53 przelączając się na wysoki poziom powoduje przekroczenie przez czynniki apoptotyczne poziomu krytycznego i rozpoczęcie procesu kontrolowanej śmierci komórki. Oprócz kontrolowania transkrypcji genów mu podległych aktywne p53 powoduje również zmniejszenie tempa transkrypcji genów zależnych od $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (działanie szerzej omówione poniżej), w tym jego inhibitorów $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ i A20 . Tym samym model łączny jest układem z dwoma wejściami oraz pięcioma pętlami sprzężenia zwrotnego: trzema ujemnego wiążącymi czynniki transkrypcyjne z ich inhibitorami oraz dwoma dodatniego. Jedną wiążącą p53 z $\text{NF-}\kappa\text{B}$ oraz drugą prowadzącą przez PTEN i odpowiadającą za zainicjowanie procesu apoptozy.

W modelu łącznym możemy wyróżnić następujące kluczowe elementy:

$\text{NF-}\kappa\text{B}$ jako czynnik transkrypcyjny dla p53

Jest to pierwsze z uwzględnionych w modelu połączeń pomiędzy ścieżkami $\text{NF-}\kappa\text{B}$ i p53 . Jak wspomniano wcześniej Wu i Lozano w roku 1994 jako pierwsi pokazują, iż pojawienie się aktywnego $\text{NF-}\kappa\text{B}$ powoduje 3-7 krotne zwiększenie się poziomu p53 [103]. Następnie Kim ze swoimi współpracownikami badając komórki chrzęstne królików pokazują, iż aktywacja $\text{NF-}\kappa\text{B}$ inną drogą niż poprzez $\text{TNF}\alpha$ również powoduje dodatnią regulację transkrypcji p53 [45]. Podobnie Fujioka i in. [22] prezentują wyniki świadczące o tym, iż zaktywowane $\text{NF-}\kappa\text{B}$ zwiększa ekspresję p53 oraz zwiększa jego stabilność i zdolność dołączania się do DNA. By pozostać w zgodzie z tymi doświadczeniami jak również z faktem, iż p53 jest obecne w komórce także przy nieaktywnym $\text{NF-}\kappa\text{B}$ założyliśmy, iż transkrypcja p53 jest sumą transkrypcji niezależnej oraz zależnej od $\text{NF-}\kappa\text{B}$ oraz, że przy-

łączenie się NF- κ B do obszaru promotora p53 zwiększa produkcję jego mRNA dwukrotnie.

Aktywne p53 jako czynnik zmniejszający tempo transkrypcji białek zależnych od NF- κ B

Drugie z wykorzystanych połączeń obu ścieżek wprowadza do modelu kolejną pętlę dodatniego sprzężenia zwrotnego. Fakt, że p53 jak i składnik kompleksu NF- κ B zwany p65 (RelA) wzajemnie osłabiają swą działalność jako czynników transkrypcyjnych oraz rywalizują o p300 i CBP będące współ-aktywatorami transkrypcji, zwiększającymi jej wydajność, jest dość dobrze udokumentowany w literaturze. Opisują go zarówno Wadgaonkar i in. ([93]) jak i Webster z Perkinsem w [96] oraz Ikeda i in. w [36]. Bartke i in. w [4] pokazali, że sama translokacja NF- κ B nie jest zakłócana poprzez p53, podczas gdy transkrypcja genów od niego zależnych zmniejsza się czterokrotnie. W ostatnim czasie Kawauchi i in. pokazują, iż p53 zwiększa zdolność NF- κ B do przyłączania się do DNA poprzez acetylację i fosforylację p65 w miejscu Ser 536, co jednak prowadzi jednocześnie do obniżenia jego zdolności transkrypcyjnych [42]. Uwzględniając powyższe odkrycia w modelu założono, iż tempo produkcji mRNA $I\kappa B\alpha$ oraz A20 jest proporcjonalne do

$$\frac{h_1}{h_1 + P53_{pn}(t)} \quad (7.1)$$

gdzie $P53_{pn}$ oznacza ilość aktywnych molekuł p53 w jądrze komórkowym. By uniknąć zagnieżdżenia się sprzężeń zwrotnych pominięto potencjalną możliwość osłabiania przez p53 swej własnej transkrypcji regulowanej przez NF- κ B, zakładając w zamian, iż aktywacja przez NF- κ B genu p53 zwiększa tempo produkcji jego mRNA jedynie dwukrotnie, a więc znacznie mniej niż sugeruje to Kim i in. [45].

Aktywacja układu

Jak wspomniano wcześniej zbudowany model posiada dwa wejścia: Aktywację receptorów TNFR1 poprzez pojawienie się w otoczeniu komórki ligandu TNF α oraz powstanie uszkodzenia DNA na skutek promieniowania jonizującego (IR). Samo oddziaływanie wymuszeń na układ nie zmieniło się znacznie w stosunku do modeli wyjściowych.

Uwzględniając informacje zawarte w [79] przyjęto, że dawka 1 Gy powoduje powstanie około 40 podwójnych pęknięć nici DNA (poprzednio 35). Powstałe uszkodzenie DNA jest wykrywane przez kinazy takie jak ATM, co skutkuje zwiększeniem się tempa degradacji Mdm2 oraz aktywacją i stabilizacją p53, które po fosforylacji działa jak czynnik transkrypcyjny. Założono, że proces uszkodzania DNA jest procesem Poissona, zaś zależności tempa aktywacji p53 i degradacji Mdm2 od ilości uszkodzeń wyrażają się funkcją Hilla o współczynniku równym 2.

Druga droga aktywacji układu wiedzie przez receptory, które po swej aktywacji fosforylują kinazę IKKK, co prowadzi do aktywacji białka IKK w rezultacie czego następuje degradacja $I\kappa B\alpha$ i tym samym uwolnienie z kompleksu NF- κ B, które po przedostaniu się do jądra komórkowego rozpoczyna proces transkrypcji genów od niego zależnych.

Transkrypcja i translacja

Podobnie jak we wcześniejszych modelach założono, że każdy z genów posiada dwie jednakowe kopie mogące być aktywowane i dezaktywowane niezależnie od siebie. Aktywacja następuje przez przyłączenie się do obszaru promotora czynnika transkrypcyjnego

p53 (dla genów Mdm2 i PTEN) lub NF- κ B (dla A20, I κ B α oraz p53). W modelu stochastycznym stan genu danego białka może więc być równy $G = 0, 1$ lub 2 , co oznacza, iż obie kopie są nieaktywne, jedna z nich jest aktywna bądź obie są aktywne. W przybliżeniu deterministycznym stan genu jest liczbą z przedziału $G \in \langle 0, 2 \rangle$. Przyjęto założenie, iż odczepianie się p53 od obszaru promotora (a tym samym dezaktywacja genu) następuje samoistnie, podczas gdy w przypadku NF- κ B odłączanie następuje wskutek działania I κ B α . Dodatkowo dla genów zależnych od p53 tak jak w poprzednim modelu założono ich pewną bazową aktywację, niezależną od czynnika transkrypcyjnego. Przy powyższym skłonności do aktywacji (r^b) i dezaktywacji (r^d) dla genów zależnych od p53 przedstawiają się następująco:

$$r_{p53}^b(t) = q_0 + q_1 P53_{pn}^2(t), \quad r_{p53}^d(t) = q_2, \quad (7.2)$$

zaś dla genów zależnych od NF- κ B:

$$r_{NF\kappa B}^b(t) = q_{0n} + q_{1n} NF\kappa B_n(t), \quad r_{NF\kappa B}^d(t) = q_{2n} I\kappa B\alpha_n(t). \quad (7.3)$$

Druga potęga przy aktywacji genów zależnych od p53 wynika z przyjęcia jak poprzednio, iż wolne p53 występuje w postaci dimerów, zaś kluczową rolę w aktywacji genów odgrywają jego tetramery.

Aktywacja i dezaktywacja receptorów

Część modelu oddająca procesy aktywacji i dezaktywacji receptorów TNFR1 pozostała niezmienną w stosunku do opisu przedstawionego w rozdziale czwartym. Receptory są niezależnie aktywowane i dezaktywowane ze skłonnością aktywacji równą $r_r^b(t)$ proporcjonalną do stężenia TNF $\alpha(t)$ w ich otoczeniu, przy czym stężenie to może być zależne od czasu. Skłonność do samoistnej dezaktywacji dana jest poprzez r_r^d i jest ona stała w czasie

$$r_r^b(t) = k_b TNF(t), \quad r_r^d = k_f. \quad (7.4)$$

Uszkodzanie i naprawa DNA

Stosując podejście zaprezentowane w rozdziale szóstym założono, iż uszkodzenie DNA mierzone liczbą podwójnych pęknięć nici DNA (tak zwane DSB) następuje wskutek promieniowania jonizującego zgodnie z procesem Poissona oraz na skutek działania czynników apoptotycznych, które inicjują proces cięcia DNA będący wyznacznikiem procesu apoptozy. Równania określające skłonność układu do powstania czy naprawy DNA uległy zmianie w stosunku do modelu wyjściowego, więc przesłanki na których się oparto projektując nowe zależności zostaną omówione szerzej.

Istnieje wiele czynników pro-apoptotycznych należących do rodziny białek Bcl-2 które mogą być aktywowane poprzez p53. W szczególności Nakano i Vousden w [67] pokazują, iż p53 indukuje produkcję Puma, które przyłącza się do Bcl-2 i przemieszczając się do mitochondriów powoduje uwodnienie błony mitochondrialnej, a przez to uwolnienie cytochromu C. Cytochrom C aktywuje kaspazę 9, która jak pokazał Nagata w [66] aktywuje kaspazę 3. Jedną z funkcji kaspazy 3 jest aktywacja nukleaz DFF (DNA Fragmentation

Factor) [57] oraz CAD (Caspase-Activated Deoxyribonuclease) [16], które są enzymami tnącymi DNA.

W ostatnim czasie Chen z współpracownikami zaproponowali model przełącznika decyzyjnego procesu apoptozy [11]. Zbudowany przez nich układ zakłada bistabilność. Gdy poziom czynników zwanych przez autorów "enablerami" (czynnikami apoptotycznymi) przekroczy poziom progowy, poziom pro-apoptotycznego białka z rodziny Bcl-2 zwanego Bax gwałtownie rośnie prowadząc do uwodnienia się membrany mitochondrialnej, co początkuje nieodwracalna kaskadę procesów prowadzących do kontrolowanej śmierci komórki.

By pozostać w zgodzie z danymi doświadczalnymi, modelem [11] oraz innymi modelami próbującymi opisać proces apoptozy ([15], [97], [98]) założono, iż w momencie przekroczenia przez czynniki apoptotyczne progu krytycznego (Th), następuje gwałtowny proces cięcia nici DNA, którego tempo jest znacznie większe niż tempo naprawy. W rezultacie podjęta przez komórkę decyzja o zainicjowaniu procesu apoptotycznego jest nieodwracalna. W modelu nie zaimplementowano w żaden sposób śmierci komórki (model nie przestaje działać przy przekroczeniu progu Th), więc stan apoptotyczny objawia się w nim wzrostem uszkodzeń DNA do nieskończoności, ustabilizowaniem się poziomu białka p53 w stanie wysokim oraz innych białek w swych stanach. Powyższy fakt stabilizowania się poziomów stanowi pierwsze z ograniczeń modelu. W rzeczywistości zainicjowany proces cięcia DNA zatrzymuje wszelką transkrypcję, a zaktywowane kaspazy rozpoczynają procesy proteolityczne, które powodują gwałtowny spadek poziomu białek w komórce. Drugie ograniczenie wynika z faktu, że pojawienie się w modelu nowych uszkodzeń na skutek działania czynników apoptotycznych zwiększa tempo aktywacji p53. Prowadzi to do powstania w układzie trzeciej pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego. Jednakże działanie czynników apoptotycznych rozpoczyna się w momencie gdy komórka przekroczy punkt krytyczny wyznaczany przez próg apoptozy (Th), tak więc działanie tej pętli nie może już zmienić decyzji komórki. Trzecie ograniczenie wynika z faktu, iż rozpoczęcie procesu apoptozy w modelu nie zatrzymuje procesów naprawczych. W rzeczywistości DNA jest cięte najpierw na fragmenty zawierające kilka tysięcy nukleotydów [37], a następnie na mniejsze części i nie może być w trakcie tego procesu naprawiane. W modelu tempo uszkodzania DNA przez czynniki apoptotyczne jest jak już wspomniano wielokrotnie większe od tempa jego naprawy tak, że praktycznie w stanie apoptotycznym proces naprawy jest nieaktywny i można go pominąć.

Celem pracy nie było dokładne oddanie procesu programowanej śmierci komórki, a jedynie faktu podjęcia nieodwracalnej decyzji o jej uruchomieniu, więc powyższe ograniczenia nie mają wpływu na uzyskiwane rezultaty.

Liczba uszkodzeń DNA w modelu jest zmienną stochastyczną. Uwzględniając fakty opisane powyżej, skłonność do pojawienia się nowego uszkodzenia $r^n(t)$ przedstawiona jest następującą zależnością:

$$r_{DNA}^n(t) = d_{DAM}R(t) + a_6 \left(\text{sign}(A(t) \frac{d_9}{p_1} - Th) + 1 \right), \quad (7.5)$$

gdzie stosunek p_1/d_9 jest maksymalnym poziomem czynników apoptotycznych wynikającym z równania (7.37), a_6 oddaje ich zdolność do uszkodzania DNA, R jest natężeniem promieniowania jonizującego, zaś $d_{DAM} = 40$ Gy jest wyznaczonym doświadczalnie współczynnikiem uszkodzania DNA. Th jest progiem apoptozy, który w momencie przekroczenia

przez poziom czynników apoptotycznych, zapewnia nieodwracalność decyzji o śmierci. Zastosowana forma równania gwarantuje, że gdy poziom ten jest poniżej progowego nie mają one wpływu na ilość uszkodzeń DNA.

Podobnie jak w rozdziale szóstym w modelu nie zaimplementowano wprost mechanizmu naprawy DNA. Aktywne p53 reguluje transkrypcję genów odpowiedzialnych za naprawę uszkodzeń, więc założono, że tempo tej naprawy będzie od niego zależne. Aktywacja genów w modelu zależy od kwadratu $P53_{pn}(t)$, więc skłonność $r^r(t)$ do naprawy pojedynczego uszkodzenia DNA wyraża się wzorem:

$$r_{DNA}^r(t) = d_{REP} \frac{N(t)}{N(t) + N_{SAT}} P53_{pn}^2(t). \quad (7.6)$$

powyższa forma $r^r(t)$ oddaje fakt, że gdy liczba uszkodzeń jest zbyt duża tempo ich naprawy jest ograniczone ilością kompleksów naprawczych.

7.4 Równania

Podczas budowy modelu łącznego NF- κ B i p53 jak i jego dopasowywania zmieniono w stosunku do modeli wyjściowych niektóre ze współczynników pozostawiając większość bez zmian. Przebudowano niektóre równania dodając na przykład jawnie równania na nieaktywną formę Akt czy PIP3 (PIP2). Pojawiły się również zmiany wynikające z samego połączenia modeli NF- κ B i p53. By przedstawić model łączny w jednej spójnej formie poniżej zamieszczono wszystkie jego parametry jak i równania, również te, które nie uległy zmianie, pokazując jednocześnie gdzie zmiany nastąpiły. W tabeli 7.1 i 7.2 oznaczono symbolem (N) nową w stosunku do wcześniejszych modeli zmienną bądź parametr, (Z) oznacza wartość zmienioną. Tabela 7.3 przedstawia parametry części łączącej modele NF- κ B i p53.

Zastosowane oznaczenia

- AKT_n - nieaktywna forma Akt (N)
- AKT_p - aktywne białko Akt
- MDM_t - transkrypt Mdm2
- MDM - Mdm2 w cytoplazmie
- MDM_p - sfosforylowane Mdm2 w cytoplazmie
- MDM_{pn} - sfosforylowane Mdm2 w jądrze komórkowym
- $P53_n$ - nieaktywne dimery p53 w jądrze
- $P53_{pn}$ - aktywne dimery p53 w jądrze
- $P53_t$ - transkrypt p53 (N)
- $PTEN_t$ - transkrypt PTEN
- $PTEN$ - białko PTEN w cytoplazmie

- PIP_n - nieaktywna forma PIP (PIP2) (N)
- PIP_p - aktywna forma PIP (PIP3)
- N - liczba podwójnych pęknięć nici DNA (DSB)
- B - liczba aktywnych receptorów
- R - natężenie promieniowania jonizującego w Gy
- TNF - koncentracja $TNF\alpha$ w ng/ml
- A - poziom czynników apoptotycznych
- IKK_n - neutralna forma kinazy IKK
- IKK_a - aktywne IKK
- IKK_i - nieaktywna forma IKK
- IKK_{ii} - nieaktywna, pośrednia forma IKK
- $IKKK_n$ - ilość nieaktywnego IKKK,
- $IKKK_a$ - aktywne IKKK,
- $I\kappa B$ - ilość $I\kappa B\alpha$ w cytoplazmie
- $I\kappa B_n$ - ilość $I\kappa B\alpha$ w jądrze komórkowym
- $I\kappa B_t$ - transkrypt $I\kappa B\alpha$
- $I\kappa B_p$ - sfosforylowane $I\kappa B\alpha$ w cytoplazmie
- $A20$ - ilość białka A20
- $A20_t$ - transkrypt A20
- $NF\kappa B$ - wolne NF- κ B w cytoplazmie
- $NF\kappa B_n$ - wolne NF- κ B w jądrze
- $NF\kappa B|I\kappa B$ - kompleksy (NF- κ B| $I\kappa B\alpha$) w cytoplazmie
- $NF\kappa B|I\kappa B_p$ - sfosforylowane $I\kappa B\alpha$ w kompleksie z NF- κ B w cytoplazmie
- $NF\kappa B|I\kappa B_n$ - kompleksy (NF- κ B| $I\kappa B\alpha$) w jądrze
- G_{Mdm2} - stan genu Mdm2
- G_{PTEN} - stan genu PTEN
- G_{p53} - stan genu p53 (N)
- $G_{I\kappa B}$ - stan genu $I\kappa B\alpha$
- G_{A20} - stan genu A20

- $r_{NF\kappa B}^b, r_{NF\kappa B}^d$ - skłonność aktywacji i dezaktywacji genów zależnych transkrypcyjnie od NF- κ B
- r_{p53}^b, r_{p53}^d - skłonność aktywacji i dezaktywacji genów zależnych od p53
- r_r^b, r_r^d - skłonność aktywacji i dezaktywacji receptorów
- r_{DNA}^n, r_{DNA}^r - skłonność do powstania pojedynczego uszkodzenia DNA i jego naprawy

Stan wszystkich rodzajów genów w modelu stochastycznym może przybierać wartości $G_x \in \{0, 1, 2\}$, a w przybliżeniu deterministycznym $G_x \in \langle 0, 2 \rangle$

Parametry modelu

Tabela 7.1. Parametry części NF- κ B modelu łącznego

Parametr	Opis	Wartość
$k_v=V/U$	stosunek objętości cytoplazmy do jądra	5
k_b	tempo aktywacji receptorów	$4 \times 10^{-6}/s$
k_f	tempo dezaktywacji receptorów	$6 \times 10^{-4}/s$
q_{1n}	tempo aktywacji genów p53, I κ B α i A20 zależne od NF κ B $_n$	$1.5 \cdot 10^{-7}/s$
q_{2n}	tempo dezaktywacji genów p53, I κ B α i A20 zależne od I κ B $_n$	$10^{-6}/s$
KN	całkowita liczba cząsteczek IKKK	10^4
KNN	całkowita liczba cząsteczek IKK	2×10^5
M	całkowita liczba receptorów TNFR1	10^3
NF κ B $_{tot}$	całkowita liczba cząsteczek NF κ B	10^5
k_a	tempo aktywacji IKKKn	$10^{-4}/s$
k_i	tempo dezaktywacji IKKKa	$10^{-2}/s$
c_{1n}	tempo transkrypcji A20 $_t$ i I κ B $_t$	$10^{-1}/s$
c_{3n}	tempo degradacji A20 $_t$ i I κ B $_t$	$7.5 \times 10^{-4}/s$
c_{4n}	tempo translacji A20 i I κ B	$5 \times 10^{-1}/s$
c_{5n}	tempo degradacji A20	$5 \times 10^{-4}/s$
$ka20$	współczynnik blokowania TNFR1 przez A20	10^4
k_2	tempo dezaktywacji IKKa przez A20	10^4
k_1	tempo aktywacji IKKn	$5 \times 10^{-6}/s$
k_3	tempo dezaktywacji IKKa	$3 \times 10^{-3}/s$
k_4	tempo transformacji IKKii	$5 \times 10^{-4}/s$
a_{1n}	tempo tworzenia kompleksów NF κ B I κ B	$5 \times 10^{-7}/s$
a_{2n}	tempo fosforylacji I κ B przez IKKa	$10^{-7}/s$
a_{3n}	tempo fosforylacji kompleksów NF κ B I κ B przez IKKa	$5 \times 10^{-7}/s$
tp	tempo degradacji I κ B $_p$ i I κ B $_p$ w kompleksie z NF κ B	$10^{-2}/s$
c_{5a}	tempo degradacji I κ B	$10^{-4}/s$
c_{6a}	tempo degradacji I κ B w kompleksie z NF κ B	$2 \times 10^{-5}/s$
i_1	import NF κ B do jądra komórkowego	$10^{-2}/s$
e_{2a}	export kompleksów NF κ B I κ B $_n$ z jądra komórkowego	$5 \times 10^{-2}/s$
i_{1a}	import I κ B do jądra komórkowego	$2 \times 10^{-3}/s$
e_{1a}	export I κ B z jądra komórkowego	$5 \times 10^{-3}/s$

Tabela 7.2. Parametry części p53|Mdm2 modelu łącznego

Parametr	Opis	Wartość
a_0	tempo spontanicznej aktywacji $P53_n$	$1 \times 10^{-4}/s$
a_1	tempo fosforylacji $P53_n$ wymuszone uszkodzeniem DNA	$1 \times 10^{-3}/s$
a_2	tempo aktywacji PIP	$5 \times 10^{-5}/s$
a_3	tempo aktywacji AKT	$2 \times 10^{-9}/s$
a_4 (Z)	tempo fosforylacji MDM	$7.5 \times 10^{-9}/s$
c_0	tempo hydrolizacji PIP_p przez $PTEN$	$2.5 \times 10^{-9}/s$
c_1	tempo dezaktywacji AKT_p	$2 \times 10^{-4}/s$
c_2	tempo defosforylacji MDM_p	$1 \times 10^{-4}/s$
c_3	tempo spontanicznej defosforylacji $P53_{pn}$	0
d_0	tempo spontanicznej degradacji wszystkich form Mdm2	$3 \times 10^{-5}/s$
d_1	tempo deg. wszystkich form Mdm2 wymuszone uszk. DNA	$1.5 \times 10^{-4}/s$
d_2	tempo degradacji $PTEN$	$5 \times 10^{-5}/s$
d_3	tempo spontanicznej degradacji $P53_n$	$1 \times 10^{-4}/s$
d_4	tempo degradacji $P53_n$ wymuszonej przez MDM_{pn}	$1 \times 10^{-13}/s$
d_5	tempo spontanicznej degradacji $P53_{pn}$	$1 \times 10^{-4}/s$
d_6	tempo degradacji $P53_{pn}$ wymuszonej przez MDM_{pn}	$1 \times 10^{-14}/s$
d_7	tempo degradacji MDM_t	$3 \times 10^{-4}/s$
d_8	tempo degradacji $PTEN_t$	$3 \times 10^{-4}/s$
e_0	export MDM_{pn} z jądra komórkowego	0
i_0	import MDM_p do jądra komórkowego	$5 \times 10^{-4}/s$
s_0	tempo transkrypcji MDM_t	$6 \times 10^{-2}/s$
s_1	tempo transkrypcji $PTEN_t$	$6 \times 10^{-2}/s$
t_0	tempo translacji MDM	$5 \times 10^{-1}/s$
t_1	tempo translacji $PTEN$	$1 \times 10^{-1}/s$
h_0	stała Michaelisa dla aktywacji $P53_n$ i degradacji wszystkich form Mdm2	7
q_0	tempo spontanicznej aktywacji genów Mdm2 i PTEN	$1 \times 10^{-4}/s$
q_1	tempo aktywacji genów Mdm2 i PTEN zależne od $P53_{pn}$	$5 \times 10^{-13}/s$
q_2	tempo dezaktywacji genów Mdm2 i PTEN	$3 \times 10^{-3}/s$
N_{SAT} (Z)	współczynnik nasycenia kompleksów naprawczych DNA	3
d_{DAM} (Z)	tempo uszkodzania DNA	40/Gy
d_{REP} (Z)	tempo naprawy DNA	$2 \times 10^{-14}/s$
AKT_{tot}	całkowita liczba białek Akt ($AKT + AKT_p$)	2×10^5
PIP_{tot}	całkowita liczba białek PIP ($PIP + PIP_p$)	1×10^5
a_6 (Z)	maksymalne tempo uszk. DNA przez czynniki apoptotyczne	$1 \times 10^{-2}/s$
d_9 (Z)	tempo degradacji czynników apoptotycznych	$2 \times 10^{-4}/s$
p_1 (Z)	maksymalne tempo syntezy czynników apoptotycznych	200/s
q_3 (Z)	współczynnik syntezy czynników apoptotycznych	$2.5 \times 10^{-11}/s$
q_4 (Z)	współczynnik syntezy czynników apoptotycznych	1/s
Th (N)	próg śmierci apoptotycznej	6.5×10^{-1}

Tabela 7.3. Parametry części wspólnej modelu łącznego

Parametr	Opis	Wartość
d_{10}	tempo degradacji transkryptu p53	$2 \times 10^{-4}/s$
s_2	tempo transkrypcji p53 zależnej od NF- κ B	$5 \times 10^{-2}/s$
s_3	tempo transkrypcji niezależnej p53	$5 \times 10^{-2}/s$
t_2	tempo translacji p53	$5 \times 10^{-1}/s$
h_1	stała Michaelisa przy transkrypcji A20 i I κ B α	6×10^4

PTEN w cytoplazmie, $PTEN$: Pierwszy człon opisuje syntezę $PTEN$, zaś drugi jego degradację

$$\frac{d}{dt}PTEN(t) = t_1 PTEN_t(t) - d_2 PTEN(t). \quad (7.7)$$

Nieaktywna forma PIP, PIP_n : Nowe równanie dopisane w celu jawnego określenia ilości wszystkich zmiennych występujących w modelu. Pierwszy człon opisuje dezaktywację PIP przez $PTEN$, a następny jego samoistną aktywację

$$\frac{d}{dt}PIP_n(t) = c_0 PTEN(t) PIP_p(t) - a_2 PIP_n(t). \quad (7.8)$$

Aktywna forma PIP, PIP_p : Pierwszy człon opisuje aktywację PIP , zaś drugi jego hydrolizację przez $PTEN$

$$\frac{d}{dt}PIP_p(t) = a_2 PIP_n(t) - c_0 PTEN(t) PIP_p(t). \quad (7.9)$$

Nieaktywny Akt, AKT_n : Nowe równanie. Pierwszy człon opisuje dezaktywację AKT_p , a drugi aktywację AKT_n regulowaną przez PIP_p

$$\frac{d}{dt}AKT_n(t) = c_1 AKT_p(t) - a_3 AKT_n(t) PIP_p(t). \quad (7.10)$$

Aktywna forma Akt, AKT_p : Na początku aktywacja AKT_n przez PIP_p , a następnie dezaktywacja AKT_p

$$\frac{d}{dt}AKT_p(t) = a_3 AKT_n(t) PIP_p(t) - c_1 AKT_p(t). \quad (7.11)$$

Mdm2 w cytoplazmie, MDM : Pierwszy człon opisuje syntezę MDM , drugi defosforylację MDM_p , trzeci fosforylację MDM regulowana przez AKT_p , zaś ostatni degradację MDM

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}MDM(t) = & t_0 MDM_t(t) + c_2 MDM_p(t) \\ & - a_4 MDM(t) AKT_p(t) - \left(d_0 + d_1 \frac{N^2(t)}{h_0^2 + N^2(t)} \right) MDM(t). \end{aligned} \quad (7.12)$$

Sfosforylowane Mdm2 w cytoplazmie, MDM_p : Na początku fosforylacja MDM regulowana przez AKT_p , następnie defosforylacja MDM_p , trzeci i czwarty człon opisują import do i eksport z jądra komórkowego, na końcu degradacja MDM_p

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}MDM_p(t) = & a_4 MDM(t) AKT_p(t) - c_2 MDM_p(t) - i_0 MDM_p(t) \\ & + e_0 MDM_{pn}(t) - \left(d_0 + d_1 \frac{N^2(t)}{h_0^2 + N^2(t)} \right) MDM_p(t). \end{aligned} \quad (7.13)$$

Sfosforylowane Mdm2 w jądrze, MDM_{pn} : Pierwsze dwa człony opisują import i export z jądra komórkowego do cytoplazmy, podczas gdy ostatni swobodną i wymuszoną uszkodzeniem DNA degradację MDM_{pn}

$$\frac{d}{dt}MDM_{pn}(t) = i_0 MDM_p(t) - e_0 MDM_{pn}(t) - \left(d_0 + d_1 \frac{N^2(t)}{h_0^2 + N^2(t)} \right) MDM_{pn}(t). \quad (7.14)$$

Nieaktywne p53 w jądrze, $P53_n$: Pierwszy człon opisuje syntezę $P53_n$, drugi spontaniczną jak i wymuszoną uszkodzeniem DNA aktywację, trzeci dezaktywację $P53_{pn}$, zaś ostatni jego degradację zarówno spontaniczną jak i wymuszoną przez MDM_{pn}

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}P53_n(t) = & t_2 P53_t(t) - \left(a_0 + a_1 \frac{N^2(t)}{h_0^2 + N^2(t)} \right) P53_n(t) + c_3 P53_{pn}(t) \\ & - \left(d_3 + d_4 MDM_{pn}^2(t) \right) P53_n(t). \end{aligned} \quad (7.15)$$

Aktywna forma jądrowego p53, $P53_{pn}$: Na początku mamy aktywację $P53_n$ swobodną jak i wymuszoną, następnie dezaktywację $P53_{pn}$ i na końcu jego degradację zarówno spontaniczną jak i regulowaną przez MDM_{pn}

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}P53_{pn}(t) = & \left(a_0 + a_1 \frac{N^2(t)}{h_0^2 + N^2(t)} \right) P53_n(t) - c_3 P53_{pn}(t) \\ & - \left(d_5 + d_6 MDM_{pn}^2(t) \right) P53_{pn}(t). \end{aligned} \quad (7.16)$$

Transkrypt Mdm2, MDM_t : Na początku transkrypcja MDM_t , a następnie jego degradacja

$$\frac{d}{dt}MDM_t(t) = s_0 G_{Mdm2} - d_7 MDM_t(t). \quad (7.17)$$

Transkrypt PTEN, $PTEN_t$: Pierwszy człon opisuje transkrypcję $PTEN_t$, zaś drugi jego degradację

$$\frac{d}{dt}PTEN_t(t) = s_1 G_{PTEN} - d_8 PTEN_t(t). \quad (7.18)$$

Transkrypt p53, $P53_t$: Nowe równanie konieczne do połączenia modeli. Pierwszy człon opisuje niezależną produkcję $P53_t$, podczas gdy drugi transkrypcję zależną od NF- κ B. Ostatni człon opisuje degradację $P53_t$

$$\frac{d}{dt}P53_t(t) = 2s_3 + s_2 G_{p53} - d_{10} P53_t(t). \quad (7.19)$$

IKKK w stanie nieaktywnym, $IKKKn$: Nowe równanie. Pierwszy człon opisuje spontaniczną dezaktywację kinazy IKKK. Drugi aktywację IKKK poprzez aktywne receptory $B(t)$, których działanie jest hamowane przez $A20$

$$\frac{d}{dt}IKKKn(t) = k_i IKKKa(t) - k_a \frac{k_{a20}}{k_{a20} + A20(t)} B(t) IKKKn(t). \quad (7.20)$$

IKKK w stanie aktywnym, $IKKKa$: Pierwszy człon opisuje fosforylację IKKK przez aktywne receptory $B(t)$, przy osłabiającym działaniu $A20$. Następny spontaniczną dezaktywację kinazy

$$\frac{d}{dt}IKKKa(t) = k_a \frac{k_{a20}}{k_{a20} + A20(t)} B(t) IKKKn(t) - k_i IKKKa(t). \quad (7.21)$$

IKK w stanie neutralnym, $IKKn$: Pierwszy człon opisuje odzyskiwanie $IKKn$ ze stanu przejściowego $IKKi$. Drugi aktywację $IKKn$ przez $IKKKa$

$$\frac{d}{dt}IKKn(t) = k_4 IKKi(t) - k_1 IKKKa(t) IKKn(t). \quad (7.22)$$

Aktywne IKK, $IKKa$: Pierwszy człon opisuje przejście $IKKn$ w $IKKa$ pod wpływem $IKKKa$, zaś drugi przekształcenie $IKKa$ w formę nieaktywną $IKKi$ kontrolowane przez $A20$

$$\frac{d}{dt}IKKa(t) = k_1 IKKKa(t) IKKn(t) - k_3 IKKa(t) \frac{k_2 + A20(t)}{k_2} \quad (7.23)$$

Nieaktywna forma IKK, $IKKi$: Pierwszy człon opisuje przejście $IKKa$ w $IKKi$ pod wpływem $A20$, człon drugi opisuje samoistne przejście $IKKi$ w formę pośrednią $IKKi$

$$\frac{d}{dt}IKKi(t) = k_3 IKKa(t) \frac{k_2 + A20(t)}{k_2} - k_4 IKKi(t). \quad (7.24)$$

Pośrednia forma IKK, IKKii: Nowe równanie. Pierwszy człon opisuje samoistne tworzenie się IKKii z IKKi, a następny również samoistne przekształcenie formy pośredniej w formę neutralną IKKn

$$\frac{d}{dt}IKKii(t) = k_4 IKKi(t) - k_4 IKKii(t). \quad (7.25)$$

Sfosforylowane I κ B α , I κ B $_p$: Pierwszy człon opisuje fosforylację I κ B α poprzez IKKa, drugi jego degradację

$$\frac{d}{dt}I\kappa B_p(t) = a_{2n} IKKa(t) I\kappa B(t) - t_p I\kappa B_p(t). \quad (7.26)$$

Sfosforylowane I κ B α w kompleksie z NF- κ B, NF κ B|I κ B $_p$: Pierwszy człon opisuje fosforylację I κ B α (będącego w kompleksie z NF κ B) przez katalityczne działanie IKKa, zaś drugi opisuje degradację I κ B α , przy której odzyskiwane jest z kompleksu NF- κ B

$$\frac{d}{dt}(NF\kappa B|I\kappa B_p)(t) = a_{3n} IKKa(t) (NF\kappa B|I\kappa B)(t) - t_p (NF\kappa B|I\kappa B_p)(t). \quad (7.27)$$

Wolne NF- κ B w cytoplazmie, NF κ B: Pierwsze dwa człony opisują uwalnianie NF κ B z kompleksu NF κ B|I κ B α na skutek degradacji I κ B α oraz związane z tworzeniem się tych kompleksów zmniejszanie się liczby wolnego NF κ B. Człon trzeci opisuje uwalnianie NF κ B poprzez degradację sfosforylowanego I κ B α . Ostatni człon opisuje import wolnego NF- κ B do jądra komórkowego

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}NF\kappa B(t) &= c_{6a} (NF\kappa B|I\kappa B)(t) - a_{1n} NF\kappa B(t) I\kappa B(t) \\ &+ t_p (NF\kappa B|I\kappa B_p)(t) - i_1 NF\kappa B(t). \end{aligned} \quad (7.28)$$

Wolne NF- κ B w jądrze komórkowym, NF κ B $_n$: Pierwszy człon opisuje import do jądra komórkowego. Następny ubytek wolnego NF κ B w jądrze na skutek jego wiązania z jądrowym I κ B α . Dodatkowy współczynnik $k_v = V/U$, (stosunek objętości cytoplazmy do objętości jądra komórkowego) oddaje większe stężenia występujące w jądrze przy tej samej liczbie molekuł na skutek jego mniejszych rozmiarów

$$\frac{d}{dt}NF\kappa B_n(t) = i_1 NF\kappa B(t) - a_{1n} k_v NF\kappa B_n(t) I\kappa B_n(t). \quad (7.29)$$

Białko A20, A20: Translacja mRNA oraz degradacja białka

$$\frac{d}{dt}A20(t) = c_{4n} A20_t(t) - c_{5n} A20(t). \quad (7.30)$$

Transkrypt A20, $A20_t$: Pierwszy człon opisuje transkrypcję mRNA A20 z aktywnych kopii genu osłabianą przez P53, zaś drugi degradację transkryptu A20

$$\frac{d}{dt}A20_t(t) = c_{1n} \frac{h_1}{h_1 + P53_{pn}} G_{A20} - c_{3n} A20_t(t). \quad (7.31)$$

Wolne $I\kappa B\alpha$ w cytoplazmie, $I\kappa B$: Pierwszy człon opisuje fosforylację $I\kappa B$ przez $IKKa$, następny przyłączanie się $I\kappa B$ do $NF\kappa B$. Kolejny opisuje translację transkryptu oraz samoistna degradacja $I\kappa B$. Ostatnie dwa człony opisują import do jądra komórkowego i export do cytoplazmy

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}I\kappa B(t) = & -a_{2n} IKKa(t) I\kappa B(t) - a_{1n} NF\kappa B(t) I\kappa B(t) \\ & + c_{4n} I\kappa B_t(t) - c_{5a} I\kappa B(t) \\ & - i_{1a} I\kappa B(t) + e_{1a} I\kappa B_n(t). \end{aligned} \quad (7.32)$$

Wolne $I\kappa B\alpha$ w jądrze, $I\kappa B_n$: Pierwszy człon opisuje tworzenie kompleksów $I\kappa B_n$ z $NF\kappa B_n$ (k_v , oddaje większa koncentrację w jądrze), kolejne dwa opisują import do i export z jądra komórkowego

$$\frac{d}{dt}I\kappa B_n(t) = -a_{1n} k_v NF\kappa B_n(t) I\kappa B_n(t) + i_{1a} I\kappa B(t) - e_{1a} I\kappa B_n(t). \quad (7.33)$$

Transkrypt $I\kappa B\alpha$, $I\kappa B_t$: Transkrypcja z aktywnych kopii genu hamowana przez P53 oraz degradacja transkryptu

$$\frac{d}{dt}I\kappa B_t(t) = c_{1n} \frac{h_1}{h_1 + P53_{pn}} G_{I\kappa B} - c_{3n} I\kappa B_t(t). \quad (7.34)$$

Kompleksy $NF-\kappa B|I\kappa B\alpha$ w cytoplazmie, $NF\kappa B|I\kappa B$: Pierwsze dwa człony opisują tworzenie kompleksów $NF\kappa B$ z $I\kappa B$ oraz ich degradacja. Człon trzeci opisuje fosforylację $I\kappa B\alpha$ w kompleksie z $NF-\kappa B$ przez katalityczne działanie $IKKa$. Człon ostatni opisuje export kompleksów z jądra komórkowego

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}(NF\kappa B|I\kappa B)(t) = & a_{1n} NF\kappa B(t) I\kappa B(t) - c_{6a} (NF\kappa B|I\kappa B)(t) \\ & - a_{3n} IKKa(t) (NF\kappa B|I\kappa B)(t) + e_{2a} (NF\kappa B|I\kappa B_n)(t). \end{aligned} \quad (7.35)$$

Jądrowe kompleksy $NF-\kappa B|I\kappa B\alpha$, $NF\kappa B|I\kappa B_n$: Pierwszy człon opisuje tworzenie się kompleksów poprzez przyłączanie się $I\kappa B_n$ do $NF\kappa B_n$ przy uwzględnieniu poprzez współczynnik k_v różnicy w stężeniach między cytoplazmą, a mniejszym od niej jądrem, człon drugi opisuje ich export do cytoplazmy

$$\frac{d}{dt}(NF\kappa B|I\kappa B_n)(t) = a_{1n} k_v NF\kappa B_n(t) I\kappa B_n(t) - e_{2a} (NF\kappa B|I\kappa B_n)(t). \quad (7.36)$$

Poziom czynników apoptotycznych, A: Podobnie jak w modelu p53|Mdm2 opisanym w rozdziale szóstym założono, iż aktywne p53 reguluje produkcję tak zwanych czynników apoptotycznych. Ścieżka apoptotyczna jest bardzo rozbudowana, więc istnieje wiele białek jak Bax czy Puma mogących być identyfikowanych jako czynniki apoptotyczne. W rozprawie nie przyjęto jednak żadnego konkretnego białka do tej roli. Dla ułatwienia opisu pominięto etap mRNA czynników apoptotycznych i założono, że są one produkowane w sposób deterministyczny, regulowany ilością aktywnych cząsteczek p53. W poniższym równaniu pierwszy człon opisuje produkcję czynników apoptotycznych, zaś drugi ich degradację

$$\frac{d}{dt}A(t) = p_1 \frac{q_3 P53_{pn}^2(t)}{q_4 + q_3 P53_{pn}^2(t)} - d_9 A(t), \quad (7.37)$$

7.5 Przybliżenie deterministyczne

W przybliżeniu deterministycznym modelu łącznego stany genów, liczba aktywnych receptorów jak i ilość uszkodzeń DNA przestają być zmiennymi stochastycznymi. W takim ujęciu stany genów mogą przyjmować wartości z zakresu ciągłego $\langle 0, 2 \rangle$, liczba aktywnych receptorów jak i uszkodzeń DNA też może być ułamkowa. Z biologicznego punktu widzenia odpowiada to poziomom średnim po populacji komórek. Deterministyczne zależności prezentują się następująco:

Stan genu Mdm2, G_{Mdm2} : Pierwszy człon opisuje niezależną i zależną od p53 aktywację genu Mdm2, a następny jego samoistna dezaktywację

$$\frac{d}{dt}G_{Mdm2}(t) = (q_0 + q_1 P53_{PN}^2(t)) (2 - G_{Mdm2}(t)) - q_2 G_{Mdm2}(t), \quad (7.38)$$

Stan genu PTEN, G_{PTEN} : Podobnie jak poprzednio niezależna i zależna od p53 aktywacja, a następnie samoistna dezaktywacja

$$\frac{d}{dt}G_{PTEN}(t) = (q_0 + q_1 P53_{PN}^2(t)) (2 - G_{PTEN}(t)) - q_2 G_{PTEN}(t), \quad (7.39)$$

Stan genu $I\kappa B\alpha$, $G_{I\kappa B}$: Pierwszy człon opisuje aktywację zależną od NF- κ B, zaś drugi dezaktywację wynikającą z odczepiania NF- κ B przez $I\kappa B$ z obszaru promotora

$$\frac{d}{dt}G_{I\kappa B}(t) = q_{1n} NF\kappa B_n(t) (2 - G_{I\kappa B}(t)) - q_{2n} I\kappa B_n(t) G_{I\kappa B}(t), \quad (7.40)$$

Stan genu A20, G_{A20} : Aktywacja poprzez przyłączenie NF- κ B do obszaru promotora oraz dezaktywacja poprzez jego odczepianie z tego obszaru przez I κ B

$$\frac{d}{dt}G_{A20}(t) = q_{1n} NF\kappa B_n(t) (2 - G_{A20}(t)) - q_{2n} I\kappa B_n(t) G_{A20}(t), \quad (7.41)$$

Stan genu p53, G_{p53} : Podobnie jak u poprzednich genów zależnych transkrypcyjnie od NF- κ B aktywacja następuje poprzez jego przyłączenie do obszaru promotora, dezaktywacja poprzez jego odczepienie przez I κ B

$$\frac{d}{dt}G_{p53}(t) = q_{1n} NF\kappa B_n(t) (2 - G_{p53}(t)) - q_{2n} I\kappa B_n(t) G_{p53}(t), \quad (7.42)$$

Liczba aktywnych receptorów, B : Człon pierwszy opisuje aktywację receptorów przez TNF α , zaś człon drugi ich samoistną dezaktywację. Parametr M oznacza całkowitą liczbę receptorów TNFR1 na powierzchni komórki

$$\frac{d}{dt}B(t) = kb (M - B(t)) TNF(t) - kf B(t), \quad (7.43)$$

Liczba podwójnych pęknięć nici DNA, N : Pierwszy człon opisuje powstawanie uszkodzeń na skutek działania promieniowania (R) oraz czynników apoptotycznych (A). Człon drugi opisuje naprawę DNA.

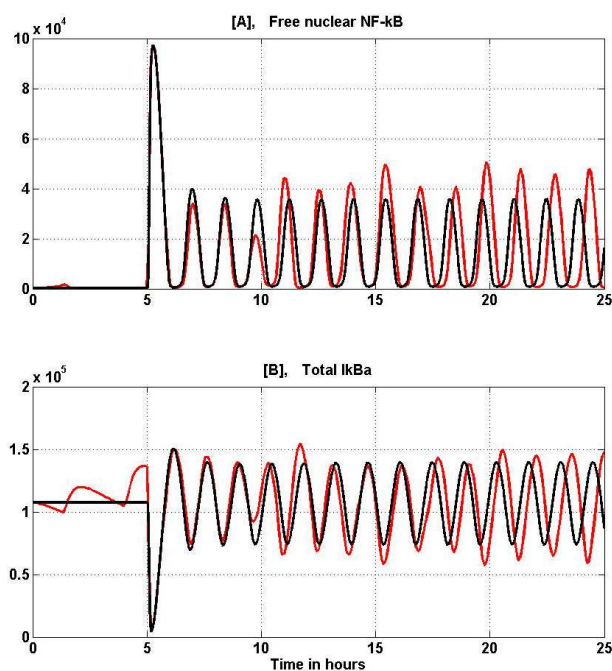
$$\frac{d}{dt}N(t) = d_{DAM}R(t) + a_6 (\text{sign}(A(t)) \frac{d_9}{p_1} - Th) + 1) - d_{REP} \frac{N(t)}{N(t) + N_{SAT}} P53_{pn}^2(t) \quad (7.44)$$

7.6 Rezultaty

Model łączny systemów NF- κ B i p53, jak wspomniano, posiada dwa wejścia w postaci stężenia TNF α w ng/ml na zewnątrz komórki oraz dawki pochłoniętego przez komórkę promieniowania IR w Gy. Pierwsze z tych wymuszeń aktywuje ścieżkę sygnałową NF- κ B, drugie zaś p53. Poniżej pokazano, iż w przypadku gdy protokół symulacji przewiduje tylko jedno z tych wymuszeń sprzężenia pomiędzy składowymi modelem łącznego nie wpływają na zachowanie się ścieżki pobudzonej i model łączny zachowuje się jak oddzielne modele. W literaturze można spotkać wiele doniesień o pro- i anty-apoptotycznej roli NF- κ B ([39], [80], [73], [72], [74],[88]). W ramach pracy przebadano zachowanie się modelu łącznego przy różnych protokołach podawania wymuszeń. Uzyskane rezultaty sugerują, że pro- i anty-apoptotyczne zachowania NF- κ B mogą wynikać z kolejności jego podawania w stosunku do podanego promieniowania. Stymulacja TNF α przed napromieniowaniem komórki zwiększa jej szanse przeżycia, podczas gdy TNF α podany po napromieniowaniu działa pro-apoptotycznie. Otrzymane wyniki opisano szczegółowo poniżej.

Zgodność modelu łącznego z modelem NF- κ B

W modelu łącznym w stosunku do modeli wyjściowych zmieniła się struktura niektórych równań oraz wartości parametrów, a co najważniejsze pojawiły się sprzężenia pomiędzy ścieżkami NF- κ B i p53. Sprawdziłem więc czy model łączny posiada taka samą dynamikę jak modele źródłowe. Pierwszym testem było sprawdzenie odpowiedzi modelu na tylko jeden rodzaj wymuszenia, TNF α lub IR. Jak widać na rysunku 7.2 przy wymuszeniu ciągłym dawką 10 ng/ml TNF α , główne zmienne części NF- κ B, to jest wolne NF- κ B w jądrze oraz całkowita ilość I κ B α , zachowują się tak jak w oddzielnym modelu opisanym w rozdziale czwartym. Na rysunku 7.2 zastosowano tę samą konwencję co na rysunku 4.8. Kolorem czerwonym zaznaczona jest przykładowa realizacja modelu stochastycznego, kolorem czarnym oznaczono wynik przybliżenia deterministycznego. Można zauważyć, że przebiegi zarówno NF- κ B w jądrze (rysunek 7.2 panel A i 4.8 panel E) jak i całkowitej ilości I κ B α (rysunek 7.2 panel B i 4.8 panel D) zgadzają się ze sobą. Podobnie zachowanie się modeli łącznego i samego NF- κ B przy wymuszeniu cztero godzinnym pulsem (odpowiednio rysunek 7.6 górny i dolny panel i rysunek 4.9 panele E i D) są zgodne. Dowodzi to,



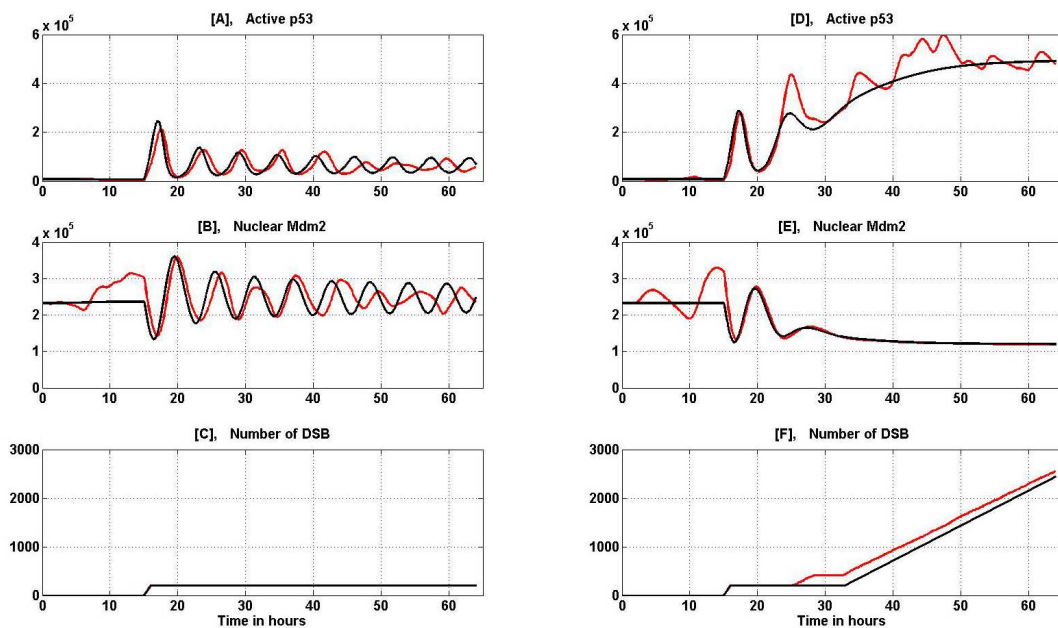
Rysunek 7.2: Zachowanie się modelu łącznego przy wymuszeniu ciągłym 10 ng/ml TNF α rozpoczynającym się w chwili $t = 5h$. Wymuszenie IR pozostaje nieaktywne. Kolorem czarnym oznaczono wyniki przybliżenia deterministycznego, kolorem czerwonym przykładową trajektorie stochastyczną.

że przy wymuszeniu jedynie za pomocą TNF α , sprzężenie dodatnie łączące NF- κ B i p53 pozostaje nieaktywne. Co prawda NF- κ B po zaktywowaniu zaczyna działać jak czynnik transkrypcyjny dla p53 zwiększając tempo jego produkcji, co widać zwłaszcza na panelu górnym rysunku 7.6, jednak z powodu szybkiej degradacji p53 przez Mdm2 wzrost ten jest na tyle niewielki (rysunek 7.6 panele górny i środkowy), że nie może w sposób zauważalny

ograniczyć produkcji inhibitorów NF- κ B jakimi są A20 i I κ B α (rysunek 7.6 panele górny i dolny).

Zgodność modelu łącznego z modelem p53

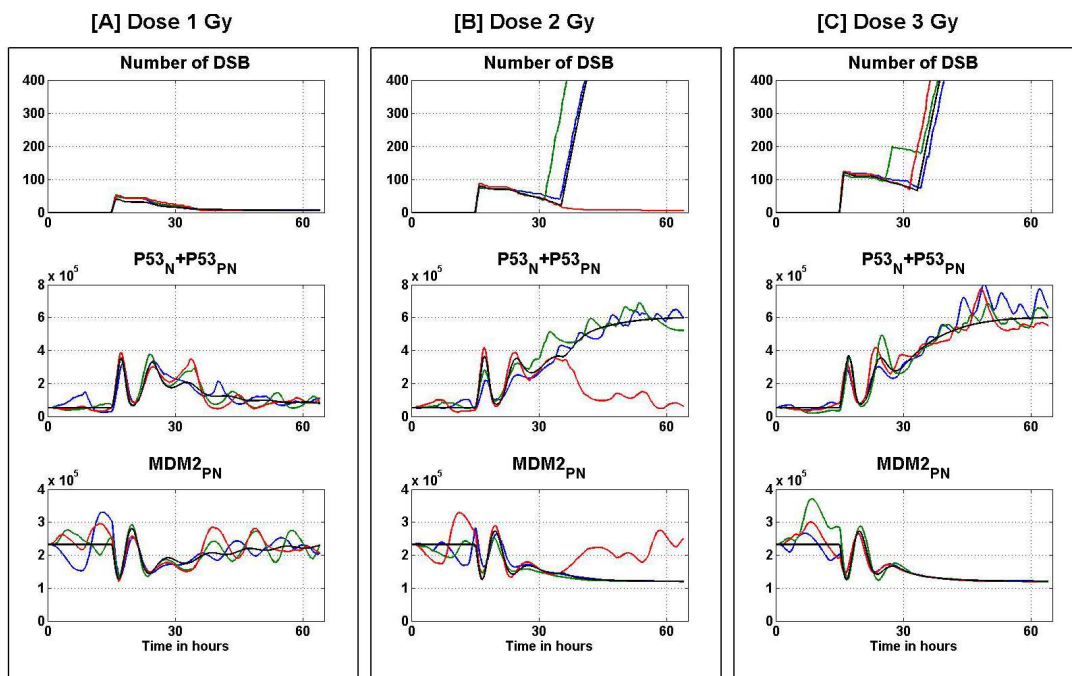
Badanie zgodności odpowiedzi modelu łącznego z oddzielnym modelem p53 dla wymuszenia zadanego jedynie przez promieniowanie jonizujące przeprowadziłem dla tych samych protokołów, dla których testowany był model źródłowy. W pierwszym z nich dla dawki promieniowania 5 Gy sprawdziłem zachowanie się układu w przypadku wyłączenia sprzężenia dodatniego biegnącego przez PTEN jak i procesów naprawy DNA (rysunek 7.3 lewa kolumna). Podobnie jak w modelu pierwotnym, kolorem czerwonym oznaczono przykładową odpowiedź modelu stochastycznego, kolorem czarnym zaś odpowiedź przybliżenia deterministycznego. Porównując rysunki 7.3 kolumna lewa z odpowiednimi panelami rysunku 6.7 można zauważyć, że odpowiadające sobie przebiegi są zgodne jakościowo. Model łączny zachowuje się tak jak model pierwotny p53, przechodząc z stanu ustalonego do cyklu granicznego. Okres oscylacji modelu łącznego jest zbliżony do okresu modelu pierwotnego i wynosi w przybliżeniu 5,5 godziny. Model łączny może więc być użyty do odwzorowania zachowania się komórek obserwowanych w eksperymencie [24].



Rysunek 7.3: Odpowiedzi modelu łącznego na wymuszenie godzinny pulsem 5 Gy IR rozpoczynającym się w chwili $t = 15h$. Wymuszenie TNF α pozostaje nieaktywne. Kolorem czarnym oznaczono trajektorie przybliżenia deterministycznego, kolorem czerwonym przykładowe trajektorie stochastyczne. Lewa kolumna odpowiada przypadkowi z wyłączoną naprawą DNA i wyłączoną produkcją PTEN. Prawa kolumna to odpowiedź układu przy wyłączonej naprawie DNA i załączonej produkcji PTEN.

Pobudzenie modelu p53 dawką 5 Gy przy wyłączonej naprawie DNA z załączoną pętlą dodatniego sprzężenia, prowadzi do uzyskania drugiego stanu ustalonego układu charakteryzującego się wysokim poziomem p53 i utożsamianego ze stanem apoptotycznym (rysunek

6.9). Stosując podobną konwencję kolorystyczną jak poprzednio, na rysunku 7.3 w prawej kolumnie przedstawiono odpowiedź modelu łącznego na ten sam protokół symulacji jak na rysunku 6.9. Jak można zauważyć układ odpowiada tak jak osobny model p53. Po kilku pierwotnych oscylacjach rozpoczyna się działanie pętli dodatniego sprzężenia łączącego p53 z PTEN, PIP3 i Akt. Blokują ona aktywację i transport Mdm2 do jądra komórkowego (rysunek 7.3 panel E), a tym samym powoduje wzrost ilości aktywnego p53, który ustala się na poziomie wyznaczającym nowy stan ustalony układu (rysunek 7.3 panel D). Przekroczenie przez poziom aktywnego p53 poziomu progowego uaktywnia czynniki apoptotyczne, które przyczyniają się do wzrostu ilości uszkodzeń DNA (rysunek 7.3 panel F), co obrazuje proces cięcia nici DNA przez DFF i CAD. Drugi stan ustalony, w którym mamy wysoki poziom p53 ma więc charakter stanu apoptotycznego.



Rysunek 7.4: Trajektoria deterministyczna (czarny) i trzy przykładowe trajektorie stochastyczne (zielony, czerwony i niebieski) odpowiedzi modelu łącznego na wymuszenie różnymi dawkami godzinowego pulsu promieniowania rozpoczynającego się w chwili $t=15$ h.

Ostatnim przypadkiem rozważanym przy okazji badania modelu p53 był przypadek współzawodnictwa pomiędzy procesami naprawy DNA i działaniem pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego. Współzawodnictwo to występuje kiedy zarówno pętla dodatniego sprzężenia biegnąca przez PTEN jak i procesy naprawy DNA są włączone. W przypadku modelu łącznego zaobserwowano podobne zachowanie jak w modelu wyjściowym, co pokazano na rysunku 7.4. Kolorem czarnym oznaczono wynik uzyskany z przybliżenia deterministycznego, pozostałe kolory przedstawiają przykładowe 3 realizacje stochastyczne. Podobnie jak w modelu p53 wielkość uszkodzenia DNA, a co za tym idzie frakcja komórek apoptotycznych rośnie wraz ze wzrostem dawki promieniowania. W przypadku dawki 1 Gy większość komórek przeżywa, przybliżenie deterministyczne też wskazuje na przeżywanie komórek. Przy dawce 2 Gy około połowa napromieniowanych komórek wraca do swojego stanu

sprzed uszkodzenia. Dawka graniczna dla przybliżenia deterministycznego wynosi 1.993 Gy, więc przy 2 Gy wskazuje ono na drugi stan ustalony modelu, czyli stan apoptotyczny. Przy dawce 3 Gy większość komórek ulega apoptozie. Zmiana wartości dawki granicznej dla przybliżenia deterministycznego (poprzednio 1.88 Gy) wynika z większej chęci zachowania w miarę zaokrąglonych wartości parametrów modelu, niż trzymania się na sztywno wcześniej ustalonej jej wartości, zwłaszcza że wartość ta jest jedynie szacunkowa.

Biorąc pod uwagę powyższą zgodność zachowania się modelu NF- κ B|p53 z pierwotnym modelem p53 można wnioskować, że występujące w modelu łącznym sprzężenie pomiędzy ścieżkami p53 i NF- κ B pozostaje nieaktywne w przypadku wymuszenia za pomocą samego napromieniowania. Analizując model można zauważyć, że napromieniowanie prowadzi do wzrostu ilości sfosforylowanego p53 w komórce (rysunek 7.7 panel górny i środkowy). Podwyższony poziom aktywnego p53 powinien obniżając poziom transkrypcji inhibitorów NF- κ B w postaci I κ B α i A20 doprowadzić do wzrostu jego poziomu. Jednak bez pobudzenia modelu łącznego przez TNF α czynnik transkrypcyjny NF- κ B znajduje się w stanie nieaktywnym w cytoplazmie uwięziony w kompleksach z wcześniej wyprodukowanym I κ B α (rysunek 7.7 panel górny i dolny), tym samym produkcja nowych cząsteczek inhibitorów i tak występuje w formie szczątkowej.

Wniosek ten łącznie z wnioskiem wynikającym z obserwacji modelu łącznego przy wymuszeniu za pomocą jedynie TNF α prowadzi do konkluzji, że wprowadzone do modelu łącznego sprzężenia łączące obie wspomniane ścieżki są nieaktywne przy wymuszeniu uaktywniającym tylko jedną z nich. Do pełnej aktywacji układu potrzebne są zatem oba wymuszenia.

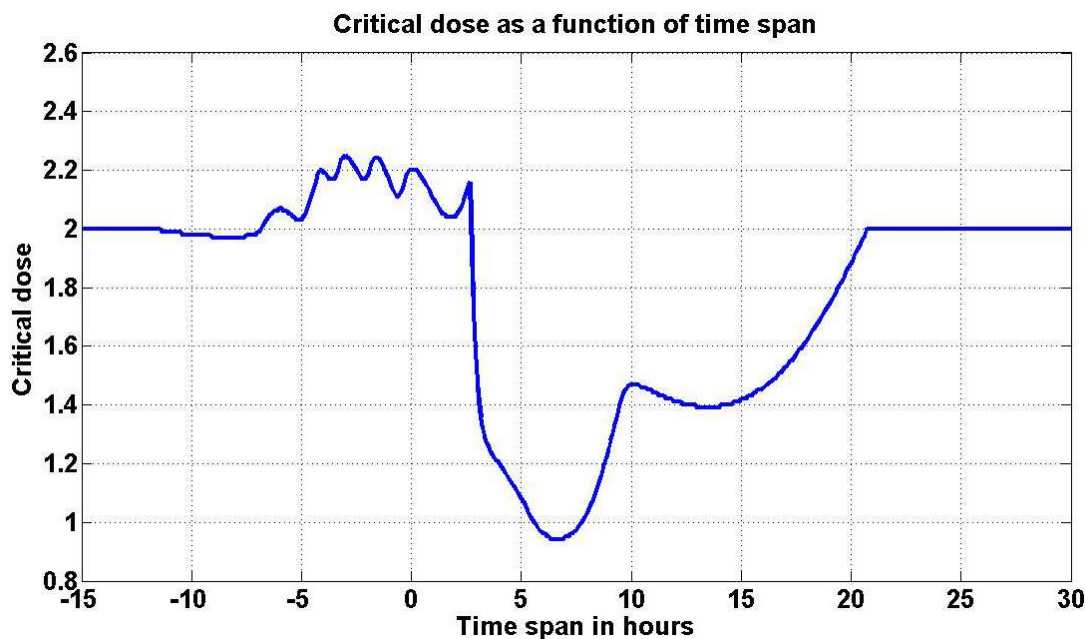
Zależność wielkości frakcji komórek apoptotycznych od protokołu wymuszeń

Po sprawdzeniu zgodności modelu łącznego z modelami p53 i NF- κ B zbadałem zachowanie się modelu przy zastosowaniu wymuszenia przy pomocy obydwu sygnałów wejściowych. W trakcie badania postawiono hipotezę, iż działanie ścieżki NF- κ B może być zarówno pro- jak i anty-apoptotyczne w zależności od protokołu wymuszeń. Pro- i anty-apoptotyczność działania NF- κ B wyrażać się powinna w wielkości frakcji komórek apoptotycznych przy danym wymuszeniu. W celu zminimalizowania wpływu protokołu naświetlania na działanie ścieżki NF- κ B zdecydowano, iż wymuszenie IR załączane będzie zgodnie z wcześniejszym jednogodzinnym protokołem. Dawkę naświetlania ustalono na 2 Gy - wartość bliską wartości progowej. Dzięki takiemu jej doborowi uniknięto sytuacji, gdy DNA modelowanych komórek mogłoby zostać uszkodzone na tyle silnie bądź na tyle słabo, iż wpływ NF- κ B na ich los byłby znikomy. Następnie ustalono arbitralnie okres podawania TNF α na 4 godziny. Długość ta daje w przybliżeniu 4 pulsy NF- κ B (rysunek 7.6 panel górny) co zapewnia, iż wpływ tego wymuszenia na ścieżkę p53 będzie zauważalny (okres oscylacji p53 wynosi ok 5.5 godziny). Tak dobrany, krótki czas wymuszenia pozwala również uniknąć sytuacji, w której uaktywniane są zarówno pro- jak i anty-apoptotyczne działania NF- κ B. Dawkę TNF α wymuszenia ustalono na 10 ng/ml co zapewnia, iż badany układ zostanie zaktywowany.

Po wybraniu długości poszczególnych wymuszeń ustaliłem optymalne protokoły zapewniające maksymalne działanie anty-apoptotyczne jak i pro-apoptotyczne NF- κ B. W tym celu posłużyłem się przybliżeniem deterministycznym modelu łącznego.

Dawka krytyczna przybliżenia deterministycznego oznacza graniczną wartość promieniowania, po której przekroczeniu komórka doznaje zbyt wielu uszkodzeń i nie może być naprawiona, a więc układ nie wraca do swojego pierwotnego stanu ustalonego przechodząc

do stanu apoptotycznego. W interpretacji stochastycznej można uznać, iż dawka krytyczna jest dawką promieniowania, powyżej której komórka ma większe szanse ulec apoptozie niż przeżyć bądź patrząc z poziomu populacji komórek jest to dawka, powyżej której frakcja komórek apoptotycznych jest większa niż komórek przeżywających. Jak wspomniano, przy braku pobudzenia części NF- κ B dawka krytyczna wynosi 1.993 Gy. Zwiększenie poziomu dawki krytycznej powyżej tego poziomu przy uaktywnieniu NF- κ B oznaczać będzie mniejszą ilość komórek apoptotycznych przy założonym wymuszeniu IR równym 2 Gy, a więc działanie anti-apoptotyczne. Zmniejszenie dawki krytycznej oznaczające zwiększenie się ilości komórek apoptotycznych przy stałym wymuszeniu IR, wskazuje zatem na działanie pro-apoptotyczne. Na rysunku 7.5 przedstawiono zależność dawki krytycznej od przesunięcia w czasie początków 1h pulsu IR i 4h TNF α . Wartość 0 godzin oznacza, iż oba wymuszenia zaczynają działać w tej samej chwili, wartości ujemne oznaczają, iż wymuszenie za pomocą TNF α zaczyna się przed IR, wartości dodatnie, że po tym wymuszeniu. Jak można zauważyć jeżeli przesunięcie jest większe niż ok -12h lub 21h, to pobudzenie



Rysunek 7.5: Zależność dawki krytycznej od przesunięcia w czasie początków wymuszeń: 1 godzinowego pulsu IR i 4 godzinowego pulsu TNF α . Wartości ujemne oznaczają, że wymuszenie za pomocą ligandu następuje przed promieniowaniem. Wartości dodatnie, iż najpierw następuje napromieniowanie, a następnie stymulacja TNF α

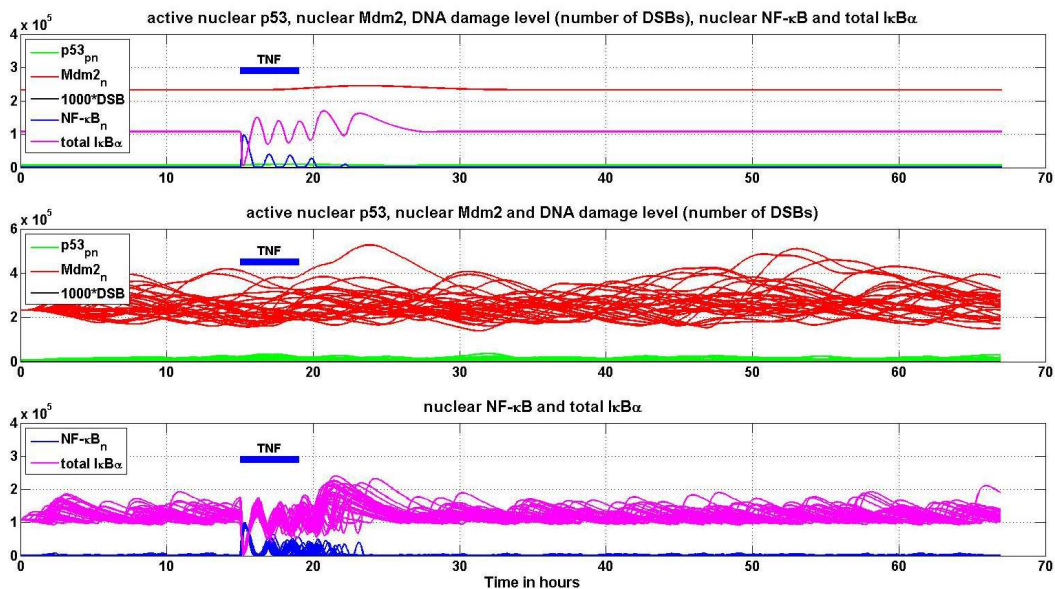
ścieżki NF- κ B nie ma wpływu na wielkość frakcji apoptotycznej. Przy przesunięciu -3h osiągnięto maksymalną wielkość dawki krytycznej równą 2.25 Gy, co oznacza iż przy takim przesunięciu wymuszeń NF- κ B ma najsilniejsze działanie anti-apoptotyczne. Wartość minimalną funkcja osiąga dla przesunięcia pomiędzy 6.5 a 7 godzin i wynosi ona 0.95, tak więc przesunięcie w tym przedziale daje nam najmocniejsze działanie pro-apoptotyczne NF- κ B. Przesunięcia -3h oraz 7h wybrano do dalszych badań.

Rysunki 7.6 i 7.7 stanowiły wzorzec do oceny wpływu sprzężenia ścieżek p53 i NF- κ B w modelu łącznym na odpowiedź komórki przy różnych protokołach wymuszeń. Przed-

stawiają one 30 przykładowych odpowiedzi modelu stochastycznego (panele środkowy i dolny) oraz przybliżenia deterministycznego (panel górny) na wymuszenie odpowiednio za pomocą samego $\text{TNF}\alpha$ i samego IR zgodnie z wybranymi protokołami (4h wymuszenie dawką 10ng/ml $\text{TNF}\alpha$ i 1h wymuszenie 2Gy IR).

Działanie anty-apoptotyczne $\text{NF-}\kappa\text{B}$

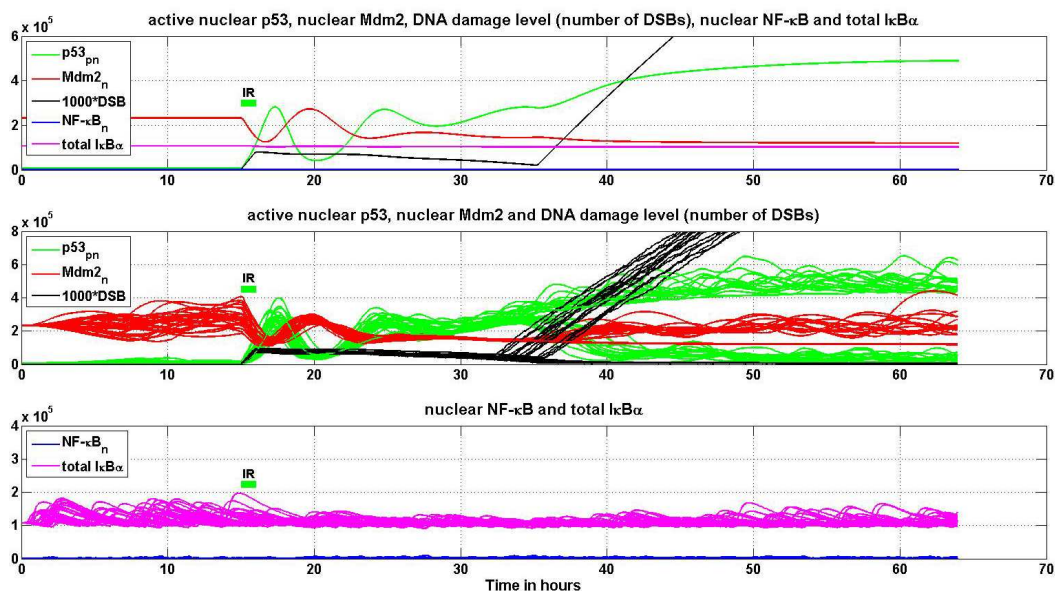
Pojawienie się aktywnego $\text{NF-}\kappa\text{B}$ w jądrze komórkowym na skutek działania $\text{TNF}\alpha$ prowadzi do dwukrotnego zwiększenia się produkcji transkryptu p53. Powoduje to, iż pomimo silnego działania Mdm2 degradującego p53, jego poziom rośnie (rysunek 7.6 $5h < t < 10h$). Wzrost ten jest na tyle niewielki, iż nie ma znaczącego wpływu na wydajność transkrypcji genów zależnych od $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Pojawienie się w czasie gdy p53 jest skumulowane uszkodzenia DNA będącego jego aktywatorem, powoduje gwałtowną fosforylację p53. Jak wspomniano w czasie 4h trwania wymuszenia $\text{TNF}\alpha$ poziom aktywnego $\text{NF-}\kappa\text{B}$ wykazuje cztery piki. Przy przesunięciu początków wymuszeń o -3h trzy pierwsze piki kumulują p53, natomiast czwarty działa dokładnie w chwili aktywacji p53 po napromieniowaniu dodatkowo podbijając poziom pierwszego z pików odpowiedzi p53 (rysunek 7.8). Wyższy pierwszy pik oznacza szybszą naprawę DNA w czasie, gdy czynniki apoptotyczne nie są jeszcze skumulowane do poziomu wystarczającego na załączenie procesu apoptozy. Szybsza naprawa DNA oznacza, iż więcej komórek zdąży przed załączeniem się pętli dodatniego sprzężenia i przeżyje.



Rysunek 7.6: Zachowanie się modelu łącznego przy wymuszeniu 4 godzinnym pulsem 10ng/ml $\text{TNF}\alpha$ rozpoczynającym się w chwili $t = 15h$, przy braku wymuszenia IR. Górny panel przedstawia wyniki przybliżenia deterministycznego, panele środkowy i dolny przykładowe 30 realizacji modelu stochastycznego.

Analizując dokładniej odpowiedzi układu można zauważyć, że w chwili $t < 15h$, czyli przed którymkolwiek z wymuszeń, przybliżenie deterministyczne modelu znajduje się w stanie ustalonym (rysunek 7.8 górny panel). Poziomy inhibitorów Mdm2 (czerwony) i

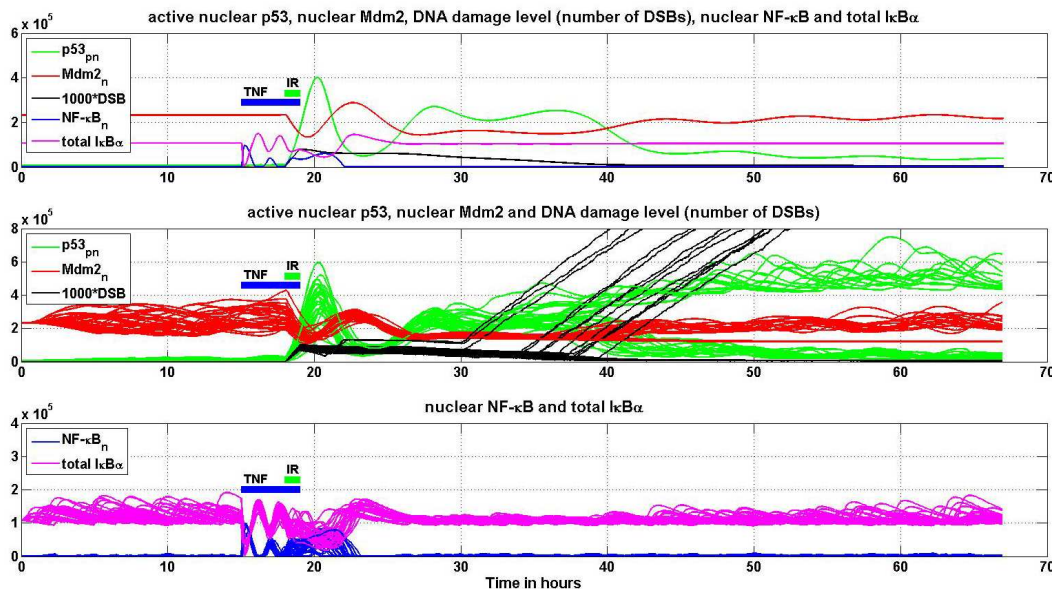
$I\kappa B\alpha$ (różowy) są wysokie, a odpowiadających im czynników transkrypcyjnych p53 (zielony) i NF- κ B (niebieski) niskie. W chwili $t = 0h$ następuje załączenie wymuszenia poprzez $TNF\alpha$. Na skutek degradacji przez IKK poziom $I\kappa B\alpha$ gwałtownie spada. Uwolnione NF- κ B przedostaje się do jądra komórkowego i rozpoczyna transkrypcje swych inhibitorów oraz p53. Z powodu występowania omówionych już ujemnych sprzężeń zwrotnych w ścieżce NF- κ B jego poziom w jądrze zaczyna oscylować. W tym samym czasie zwiększa się poziom aktywnego p53 w jądrze (rysunek 7.6 górny panel $15h < t < 18h$). W chwili $t = 18h$ rozpoczyna się naświetlanie komórki, co powoduje znaczący wzrost liczby uszkodzeń DNA (kolor czarny). Uszkodzenie DNA powoduje zwiększenie tempa degradacji Mdm2 oraz aktywację p53, co prowadzi do wzrostu poziomu jego aktywnej formy w jądrze (rysunek 7.8 górny panel czas ok 20 godziny). Aktywne p53 hamuje proces transkrypcji inhibitorów NF- κ B, co objawia się znacznie słabszym trzecim pikiem $I\kappa B\alpha$, a co za tym idzie brakiem pojawienia się "doliny" w poziomie NF- κ B oraz silniejszym jego czwartym pikiem (rysunek 7.8 panel górny czas $19h < t < 21h$). Wyższy poziom NF- κ B działając poprzez sprzężenie dodatnie powoduje zwiększenie się dodatkowo tempa transkrypcji p53. Porównując górne



Rysunek 7.7: Zachowanie się modelu łącznego przy wymuszeniu godzinnym pulsem 2 Gy IR rozpoczynającym się w chwili $t = 15h$, przy braku wymuszenia $TNF\alpha$. Górny panel przedstawia wyniki przybliżenia deterministycznego, panele środkowy i dolny przykładowe 30 realizacji modelu stochastycznego.

panele rysunków 7.8 i 7.7 można zauważyć, że w przypadku gdy wymuszenie promieniowaniem IR poprzedzone jest wymuszeniem za pomocą $TNF\alpha$, to wysokość pierwszego pików p53 wzrasta o około 30 procent. Wyższy poziom pierwszego pików p53 powoduje zwiększenie się tempa naprawy DNA oraz szybszy wzrost poziomu czynników apoptotycznych niż w przypadku braku pobudzenia ścieżki NF- κ B. Aby czynniki apoptotyczne rozpoczęły proces niszczenia DNA ich poziom musi przekroczyć zdefiniowany wcześniej próg. Ich kumulacja przebiega stopniowo przy pojawianiu się pików p53, więc ich nagromadzenie na tym etapie jest na tyle niskie, iż nie rozpoczną one swego działania mimo szybszej swej syntezy. W przybliżeniu deterministycznym dawka krytyczna dla tak dobranego protokołu

wymuszeń wzrasta z 1.993 Gy do 2.25 Gy, co przy zadanym wymuszeniu 2 Gy oznacza, iż komórka nie ulega apoptozie jak w przypadku bez $\text{TNF}\alpha$ (rysunek 7.7 górny panel $t > 35h$), lecz zostaje wyleczona i wraca do swojego stanu wyjściowego (rysunek 7.8 górny panel $t > 40h$).



Rysunek 7.8: Odpowiedź modelu łącznego w przypadku rozpoczęcia stymulacji komórki przy pomocy 10 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ na 3 godziny przed napromieniowaniem dawką 2 Gy. Górny panel przedstawia wyniki przybliżenia deterministycznego, panele środkowy i dolny przykładowe 30 realizacji modelu stochastycznego.

Model stochastyczny wykazuje nieco inną dynamikę od przybliżenia deterministycznego. Na rysunku 7.8 panele środkowy i dolny przedstawiają wyniki symulacji 30 komórek. Symulacja stochastyczna rozpoczyna się z poziomu stanu ustalonego dla przybliżenia deterministycznego ($t = 0h$). Dla czasu $t < 15h$ komórki oscylują wokół stanu ustalonego wykazując silną desynchronizację. Pojawienie się wymuszenia $\text{TNF}\alpha$ powoduje synchronizację poziomów białek należących do części $\text{NF-}\kappa\text{B}$ modelu łącznego, przy czym białka części p53 dalej pozostają rozsynchronizowane. W trakcie dalszej symulacji synchronizacja zanika. Główną różnicą zachowania się modelu stochastycznego i jego przybliżenia deterministycznego w tym przypadku jest fakt, że o ile w przybliżeniu deterministycznym wzrost dawki krytycznej na skutek działania $\text{NF-}\kappa\text{B}$ powodował, iż komórka ulegała wyleczeniu zamiast apoptozie, to w przypadku modelu stochastycznego zwiększa się jedynie szansa na wyleczenie, przy czym nie osiąga ona 100%. Porównując środkowe panele rysunków 7.7 i 7.8 można zauważyć mniejszą liczbę komórek apoptotycznych na drugim z nich. Efekt anty-apoptotycznego działania $\text{NF-}\kappa\text{B}$ widoczny jest wyraźnie na rysunku 7.10 Zastosowane przed IR wymuszenia $\text{TNF}\alpha$ spowodowało spadek liczebności frakcji apoptotycznej z 631 komórek do 555 na 1000 komórek badanych.

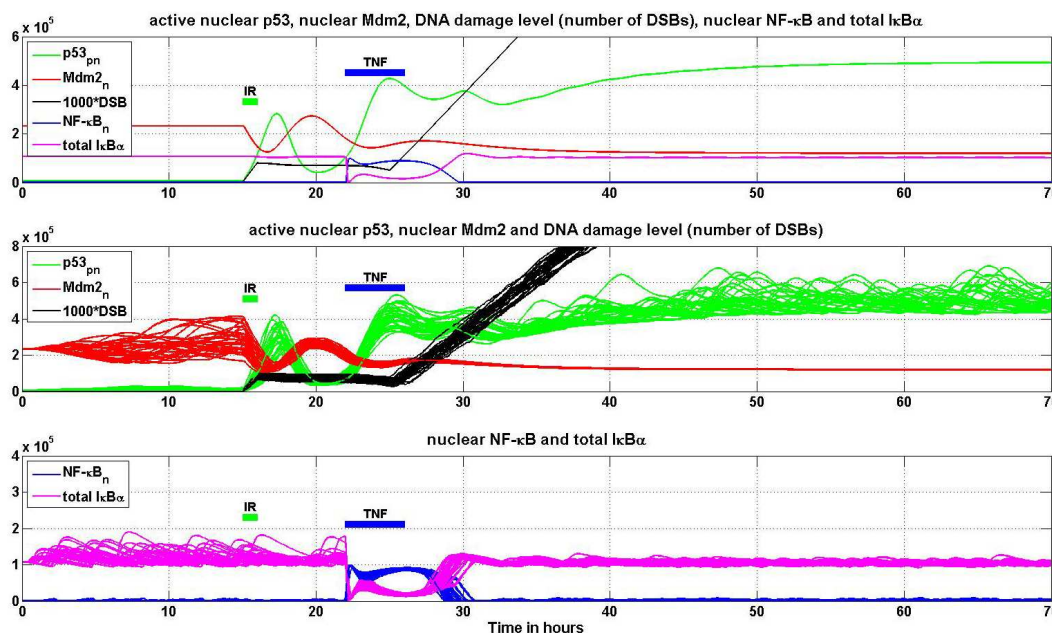
Obserwując środkowy panel rysunku 7.8 można zauważyć, że w przypadku 2 komórek nastąpiło zwiększenie się liczby uszkodzeń DNA po ustaniu wymuszenia jonizującego, po czym poziom ich uszkodzeń stopniowo się zmieszał (panel środkowy czas $21h < t < 30h$). Powstałe w chwili $t = 21h$ dodatkowe uszkodzenie spowodowane jest niezwykle silnym po-

ziomem pierwszego piksu p53, który spowodował z jednej strony dość duży stopień naprawy DNA w tych komórkach, z drugiej strony z kolei przekroczenie przez czynniki apoptotyczne poziomu progowego mimo ich niskiej jeszcze w tym czasie kumulacji. Po wynikającym z oscylacji układu obniżeniu się poziomu p53 tempo degradacji czynników apoptotycznych jest większe od tempa ich produkcji, w związku z czym ich poziom spada poniżej wartości progowej i DNA tych komórek jest ponownie naprawiane. Kolejny wzrost poziomu p53 powoduje ponownie szybkie przekroczenie progu apoptozy i komórki te umierają jako pierwsze. Powyższe zachowanie pokazuje, że okresowy wzrost poziomu p53 w wyniku oscylacji nie jest w stanie spowodować odpowiedniej kumulacji czynników apoptotycznych, a tym samym w sposób trwały włączyć mechanizmu apoptozy. Jedynie przejście układu w drugi ze stanów ustalonych charakteryzujący się stałym, wysokim poziomem p53 prowadzi do odpowiedniej kumulacji czynników apoptotycznych i śmierci komórki. W modelu znacznie uproszczono proces uszkodzania DNA przez czynniki apoptotyczne, uzależniając go jedynie od przekroczenia zadanego progu. W rzeczywistości proces ten jest bardziej skomplikowany i wymaga udziału wielu białek, można więc spodziewać się, iż w prawdziwych komórkach utworzenie się odpowiednich związków tnących DNA wymaga pewnego czasu, a więc silne impulsy p53 w początkowej fazie po wykryciu uszkodzenia DNA nie będą powodowały dalszego uszkodzania i zaistniałe w symulacji zwiększenie się poziomu DSB, w eksperymentach biologicznych może nie zostać zaobserwowane.

Działanie pro-apoptotyczne NF- κ B

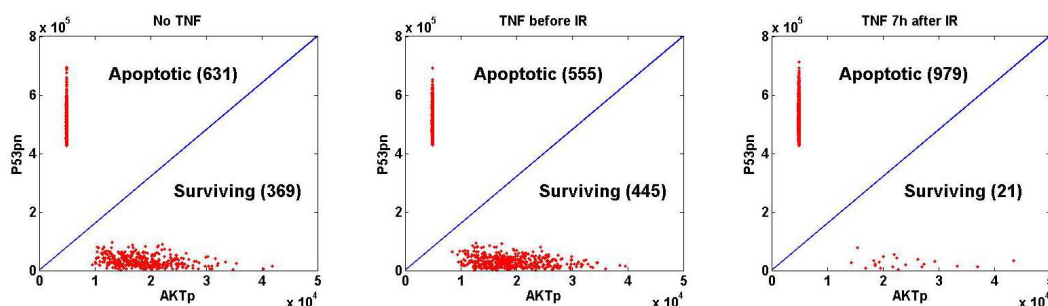
Przeciwnie, do opisanego powyżej, działanie NF- κ B można zaobserwować w sytuacji, gdy wymuszenie za pomocą TNF α następuje po wymuszeniu zadanym za pomocą IR (rysunek 7.9). Występujące jako pierwsze pobudzenie ścieżki p53 powoduje jego aktywację, co prowadzi do wzrostu poziomu sfosforylowanego p53 w jądrze komórkowym. Aktywne p53 hamuje procesy transkrypcji inhibitorów NF- κ B. W rezultacie po pojawieniu się aktywnej formy czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, nie jest on w stanie wyprodukować wystarczającej ilości I κ B α by zainicjować wyraźne oscylacje w swym module. NF- κ B pozostaje więc na poziomie wysokim ($22h < t < 28h$) zwiększając dwukrotnie tempo transkrypcji p53 (sprzężenie dodatnie). Powoduje to zwiększenie się poziomu drugiego piksu oscylacji p53 (rysunek 7.7 i 7.9 panele górny i środkowy) w czasie, gdy czynniki apoptotyczne uległy wystarczającej kumulacji, by jego podniesienie powodowało przekroczenie przez nie poziomu progowego. W rezultacie ilość uszkodzeń DNA zaczyna gwałtownie rosnać (rysunek 7.9 $25h < t < 30h$), co skutkuje zwycięstwem pętli dodatniego sprzężenia w module p53 nad procesami naprawy DNA i śmiercią komórki.

Przyglądając się bliżej można zauważyć, że podobnie jak w przypadku anty-apoptotycznego działania NF- κ B, przed zaistnieniem któregośkolwiek z wymuszeń, przybliżenie deterministycznego modelu stochastycznego znajduje się w stanie ustalonym charakteryzującym się niskim poziomem aktywnego p53 i NF- κ B (rysunek 7.9 górny panel $t < 15h$). W chwili $t = 15h$ rozpoczyna się proces napromieniania komórki dawką 2 Gy trwający godzinę czasu. Podczas napromienienia wzrasta liczba uszkodzeń DNA ($15h < t < 16h$), co prowadzi do degradacji Mdm2 oraz ustabilizowania i aktywacji p53. Sfosforylowane p53 odgrywając rolę czynnika transkrypcyjnego powoduje powstanie nowych kopii swego inhibitora Mdm2, co prowadzi do pojawienia się oscylacji w jego module regulatorowym ($15h < t < 25h$). W czasie $15h < t < 22h$ NF- κ B znajduje się uwięzione w cytoplazmie przez swój inhibitor I κ B α , więc nie może aktywować transkrypcji i działanie p53 hamujące



Rysunek 7.9: Odpowiedź modelu łącznego w przypadku rozpoczęcia stymulacji komórki przy pomocy 10 ng/ml TNF α na 7 godzin po napromieniowaniu dawką 2 Gy. Górny panel przedstawia wyniki przybliżenia deterministycznego, panele środkowy i dolny przykładowe 30 realizacji modelu stochastycznego.

produkcję białek zależnych od NF- κ B jest niezauważalne. Ujawnia się ono w momencie pojawienia się drugiego z wymuszeń trwającego w czasie $22h < t < 26h$. Wymuszenie to powoduje aktywację receptorów, co prowadzi do aktywacji kinaz IKKK i IKK, a w efekcie do degradacji I κ B α i uwolnienia NF- κ B. Uwolniony czynnik transkrypcyjny przedostaje się do jądra komórkowego, gdzie w związku z obecnością p53 nie jest w stanie wytworzyć takiej ilości swego inhibitora by zainicjować oscylacje. Jedynie pierwszy, najsilniejszy pik odpowiedzi NF- κ B jest na tyle wysoki, iż skutkuje słabą oscylacją ($t = 23h$). W odróżnieniu od przypadku gdy brak jest wymuszenia IR (rysunek 7.6 górny panel $15h < t < 20h$), poziom NF- κ B pozostaje wysoki, co wskutek działania dodatniego sprzężenia prowadzi do wzrostu liczby aktywnego białka p53 w jądrze komórkowym. Wzrost ten przy przesunięciu początków wymuszeń o 7h trafia w czas drugiego pik p53, wskutek czego jest on wyższy o około 40% niż przy braku wymuszenia TNF α (rysunki 7.7 i 7.9). Od pojawienia się pierwszego uszkodzenia DNA minęło już ponad 10 godzin, więc czynniki apoptotyczne miały dość czasu by się skumulować i stworzyć kompleksy tnące DNA. Skoro tempo produkcji czynników apoptotycznych zależy od ilości aktywnego p53, pojawienie się wysokiego 2 pik powoduje znaczne przyspieszenie ich powstawania w momencie, gdy ich poziom jest już dość wysoki. Dzięki temu przekroczony zostaje poziom progowy i następuje cięcie DNA. Aktywne p53 hamuje produkcję A20 i I κ B α , jednak nie blokuje jej całkowicie, dlatego po ustaniu wymuszenia aktywującego modul NF- κ B poziom tego białka stopniowo wraca do poziomu wyjściowego ($26h < t < 30h$). Spowodowany zanikiem NF- κ B w jądrze spadek produkcji p53 powoduje powstanie trzeciego niewielkiego pik w jego poziomie. Nie ma to wpływu na decyzje komórki. Nie jest ona w stanie naprawić swych uszkodzeń przed zadziałaniem pętli dodatniego sprzężenia zwrotnego, więc wskutek zablokowania aktywacji



Rysunek 7.10: Liczebność frakcji apoptotycznej w zależności od protokołu wymuszeń. W przypadku braku wymuszenia ze strony $\text{TNF}\alpha$ ginie 631 na 1000 komórek, przy stymulacji $\text{TNF}\alpha$ na 3 godziny przed IR ginie 555, a gdy wymuszenie ligandem następuje 7 godzin po rozpoczęciu napromieniowania apoptozie ulega 979 na 1000 komórek.

Mdm2, białko p53 przechodzi do poziomu wysokiego i komórka ulega apoptozie. ($t > 40h$).

Stochastyczny model zachowuje się jak przybliżenie deterministyczne z uwzględnieniem fluktuacji. Przed powstaniem wymuszenia oscyluje on wokół stanu ustalonego, przy czym widoczna jest duża desynchronizacja komórek (rysunek 7.9 panele środkowy i dolny). Pojawienie się wymuszeń powoduje synchronizację. Jak wspomniano powyżej, wskutek działania dodatniego sprzężenia zwrotnego pomiędzy modułami NF- κ B i p53, poziom tego pierwszego nie oscyluje jak przy braku pobudzenia modułu p53, lecz pozostaje w stanie wysokim zwiększając produkcję p53. Podbicie drugiego pikę aktywnego p53 powoduje znaczny wzrost poziomu czynników apoptotycznych, a tym samym znacząco podnosi szansę na powstanie kolejnych uszkodzeń, obniżając szansę naprawienia któregośkolwiek z nich. W przybliżeniu deterministycznym dawka graniczna przy tak dobranym protokole wymuszeń wynosi zaledwie 0.95 Gy, więc zastosowana w doświadczeniu dawka 2 Gy powoduje, iż prawie wszystkie komórki ulegają apoptozie. Jak pokazano na rysunku 7.10 w przypadku, gdy początek wymuszenia IR wyprzedza $\text{TNF}\alpha$ o 7h na 1000 komórek ginie 979, podczas gdy przy braku wymuszenia $\text{TNF}\alpha$ jedynie 631.

Jak wspomniano w rozdziale czwartym wymuszenie niską dawką $\text{TNF}\alpha$ (0.1ng/ml), powoduje iż nie wszystkie komórki na nie odpowiedzą. Zastosowanie wymuszenia taką dawką w modelu łącznym prowadzi do osłabienia pro- i anty-apoptotycznego działania NF- κ B, co wyraża się poprzez zbliżenie liczby komórek apoptotycznych przy podawaniu $\text{TNF}\alpha$ zarówno przed jak i po IR do przypadku gdy brak jest tego wymuszenia.

Rozdział 8

Podsumowanie

Przedstawiona rozprawa doktorska porusza problem modelowania stochastycznego i deterministycznego ścieżek sygnałowych związanych z apoptozą. Koncentruje się ona na modułach regulatorowych czynników transkrypcyjnych NF- κ B i p53 oraz występujących między nimi sprzężeniach. NF- κ B reguluje transkrypcje szeregu genów związanych z wczesną odpowiedzią immunologiczną organizmu i znane jest ze swego zarówno anty- jak i proapoptotycznego działania. Białko p53 zwane "strażnikiem genomu" odpowiada w komórce za wykrycie uszkodzenia DNA, wstrzymanie cyklu komórkowego i inicjację procesów naprawczych materiału genetycznego, a w przypadku gdy naprawa ta jest niemożliwa bądź zajmuje zbyt wiele czasu, za inicjację procesu zaprogramowanej śmierci komórki.

W rozdziałach 2-5 wyjaśniłem pojęcia biologiczne wykorzystane w rozprawie, przedstawiłem podstawowe prawa i algorytmy numeryczne służące budowie modeli. Zaprezentowałem poziom obecnej wiedzy na temat ścieżek sygnałowych p53 i NF- κ B.

W rozdziale szóstym, stanowiącym obok rozdziału siódmego główną część rozprawy zaproponowałem własny model ścieżki sygnałowej p53|Mdm2 posiadający inną, bogatszą od istniejących w literaturze dynamikę. Dotychczasowe rozwiązania bądź pomijały całkowicie pętle dodatniego sprzężenia, bądź występujące w niej opóźnienia skupiając się głównie na zamodelowaniu występujących w układzie oscylacji (Wee i Aguda [97] pomijają oscylacje skupiając się na bistabilności). W zaproponowanym w ramach rozprawy rozwiązaniu, pętla ujemnego sprzężenia zwrotnego, wraz z występującym w niej opóźnieniem, odpowiada za przełączenie układu z pierwszego stanu ustalonego do cyklu granicznego, w którym możliwa jest naprawa uszkodzonego DNA. Pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego działająca w znacznie dłuższej skali czasowej pełni rolę mechanizmu zegarowego dając komórce około 24 godzin na naprawy DNA. Jeżeli naprawa jest niemożliwa bądź zajmuje zbyt dużo czasu pętla dodatniego sprzężenia przełącza układ z cyklu granicznego do drugiego stanu ustalonego charakteryzującego się wysokim poziomem p53 i niskim Akt, co utożsamiane jest przez nas ze stanem apoptotycznym. Frakcja komórek apoptotycznych rośnie wraz z wielkością wymuszenia przekraczając 60% przy dawce 2 Gy powszechnie stosowanej jako dzienna dawka w radioterapii. Uzyskane w rozdziale szóstym rezultaty potwierdzają pierwszą z postawionych w rozprawie tez:

1. Zaprezentowany w rozprawie model ścieżki sygnałowej p53 zawiera dwie pętle sprzężenia zwrotnego. Pętla ujemnego sprzężenia wraz z występującym w niej opóźnieniem związanym z transkrypcją i translacją Mdm2 wprowadza do modelu cykl graniczny odpowiadający za obserwowane eksperymentalnie oscylacje poziomów p53 i Mdm2 występują-

ce po uszkodzeniu DNA. Sprzężenie dodatnie, w którym w związku z obecnością białek pośrednich (PTEN, PIP3 i Akt) występuje znaczne opóźnienie, pełni rolę przełącznika wprowadzając do układu bistabilność. Jeżeli naprawa uszkodzonego DNA jest wydajna, komórka wraca z cyklu granicznego do pierwotnego stanu ustalonego kojarzonego z przeżyciem. Jeżeli naprawa jest nieskuteczna, bądź zajmuje zbyt wiele czasu, działanie sprzężenia dodatniego powoduje ustalenie się wysokiego poziomu p53 w komórce przełączając ją z cyklu granicznego w drugi stan ustalony kojarzony z apoptozą. Stochastyczność procesu regulatorowego uwzględniona w modelu umożliwia separację populacji komórek poddanych naświetleniu na frakcję przeżywającą i apoptotyczną.

Zaproponowany w rozdziale siódmym stochastyczny model łączny systemów NF- κ B i p53 jest według wiedzy autora pierwszą próbą zamodelowania dynamiki takiego układu. Zawiera on pięć pętli sprzężenia zwrotnego - trzy ujemnego łączące czynniki transkrypcyjne z ich inhibitorami oraz dwie dodatniego. Pierwsza z nich wynika z połączenia pomiędzy modułami obu czynników transkrypcyjnych w postaci przyspieszania transkrypcji p53 przez NF- κ B i hamowania przez p53 produkcji inhibitorów NF- κ B. Sprzężenie to pozostaje nieaktywne w przypadku pobudzenia układu tylko jednym rodzajem sygnału. W przypadku gdy obie ścieżki wymuszenia zostają uaktywnione, pętla ta prowadzi do powstania w układzie wysokiego stanu aktywnego NF- κ B, co powoduje znaczące podniesienie się poziomu sfosforylowanego p53. Druga pętla dodatniego sprzężenia zwrotnego występująca w module p53 działa jak zegar, który w przypadku niedostatecznie efektywnej naprawy uszkodzonego DNA, przełącza układ na szlak apoptozy. Analiza zbudowanego modelu pokazała, iż w zależności od protokołu wymuszeń uaktywnione NF- κ B może mieć działanie zarówno pro- jak i anty-apoptotyczne. Rozpoczęcie wymuszenia za pomocą TNF α na trzy godziny przez IR powoduje, że frakcja komórek apoptotycznych zmniejsza się z 631 do 555 na 1000 komórek. Rozpoczęcie podawania TNF α 7 godzin po rozpoczęciu naświetlania zwiększa tę frakcję do 979 na 1000. Zaproponowany mechanizm sprzężenia NF- κ B i p53 może tłumaczyć przeciwstawne pro- i anty-apoptotyczne działanie NF- κ B. Otrzymane rezultaty usprawiedliwiają drugą z postawionych w rozprawie tez:

2. Zaproponowany model łączny systemów NF- κ B i p53, będący pierwszą próbą zamodelowania dynamiki interakcji obu czynników transkrypcyjnych, pozwala wyjaśnić obserwowane w eksperymentach anty- i pro-apoptotyczne zachowanie się NF- κ B, uzależniając je od protokołu podawania wymuszeń. Stochastyczność procesów molekularnych pozwala na separację populacji komórek na dwie frakcje: przeżywającą i podlegającą apoptozie. Wielkość frakcji apoptotycznej przy ustalonej wielkości wymuszeń IR i TNF α zależy od kolejności ich podawania. Podanie TNF α przed naświetleniem zwiększa szansę komórek na przeżycie, podczas gdy podanie go po naświetleniu zwiększa ich śmiertelność.

Modele zaproponowane w rozdziałach szóstym i siódmym pomimo oparcia na solidnych podstawach wiedzy biologicznej wciąż czekają na swoje bezpośrednie potwierdzenie eksperymentalne. Modele te, ze względu na swą modułową konstrukcję, umożliwiają dalszą rozbudowę. Uzupełnienie zbudowanego modelu łącznego NF- κ B o modele opisujące dynamikę białek pośredniczących w przekazywaniu informacji o zaistniałym uszkodzeniu, takich jak ATM czy Chk2, bądź o modele ścieżek sygnałowych aktywowanych przez p53 (jak na przykład ścieżka apoptotyczna), może stanowić przedmiot dalszych prac badawczych.

Bibliografia

- [1] E. Appella and C. W. Anderson. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem*, 268(10):2764–2772, May 2001.
- [2] C. J. Bakkenist and M. B. Kastan. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922):499–506, Jan 2003.
- [3] R. Lev Bar-Or, R. Maya, L. A. Segel, U. Alon, A. J. Levine, and M. Oren. Generation of oscillations by the p53-Mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(21):11250–11255, Oct 2000.
- [4] T. Bartke, D. Siegmund, N. Peters, M. Reichwein, F. Henkler, P. Scheurich, and H. Wajant. p53 upregulates cFLIP, inhibits transcription of NF-kappaB-regulated genes and induces caspase-8-independent cell death in DLD-1 cells. *Oncogene*, 20(5):571–580, Feb 2001.
- [5] E. Batchelor, C. S Mock, I. Bhan, A. Loewer, and G. Lahav. Recurrent initiation: a mechanism for triggering p53 pulses in response to DNA damage. *Mol Cell*, 30(3):277–289, May 2008.
- [6] M. Blonska, P. B. Shambharkar, M. Kobayashi, D. Zhang, H. Sakurai, B. Su, and X. Lin. TAK1 is recruited to the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor 1 complex in a receptor-interacting protein (RIP)-dependent manner and cooperates with MEKK3 leading to NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 280(52):43056–43063, Dec 2005.
- [7] A. M. Bode and Z. Dong. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 4(10):793–805, Oct 2004.
- [8] J. Bohuslav, L. F. Chen, H. Kwon, Y. Mu, and W. C. Greene. p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J Biol Chem*, 279(25):26115–26125, Jun 2004.
- [9] C. L. Brooks and W. Gu. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 15(2):164–171, Apr 2003.
- [10] C. J. Chang, D. J. Freeman, and H. Wu. PTEN regulates Mdm2 expression through the P1 promoter. *J Biol Chem*, 279(28):29841–29848, Jul 2004.

- [11] C. Chen, J. Cui, H. Lu, R. Wang, S. Zhang, and P. Shen. Modeling of the role of a Bax-activation switch in the mitochondrial apoptosis decision. *Biophys J*, 92(12):4304–4315, Jun 2007.
- [12] R. Cheong, A. Bergmann, S. L. Werner, J. Regal, A. Hoffmann, and A. Levchenko. Transient IkappaB kinase activity mediates temporal NF-kappaB dynamics in response to a wide range of tumor necrosis factor-alpha doses. *J Biol Chem*, 281(5):2945–2950, Feb 2006.
- [13] A. Ciliberto, B. Novak, and J. J. Tyson. Steady states and oscillations in the p53/Mdm2 network. *Cell Cycle*, 4(3):488–493, Mar 2005.
- [14] M. Cully, H. You, A. J. Levine, and T. W. Mak. Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 6(3):184–192, Mar 2006.
- [15] T. Eissing, H. Conzelmann, E. D. Gilles, F. Allgöwer, E. Bullinger, and P. Scheurich. Bistability analyses of a caspase activation model for receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 279(35):36892–36897, Aug 2004.
- [16] M. Enari, H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662):43–50, Jan 1998.
- [17] F. Essmann, I. H. Engels, G. Totzke, K. Schulze-Osthoff, and R. U. Jänicke. Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Res*, 64(19):7065–7072, Oct 2004.
- [18] P. Fei and W. S. El-Deiry. P53 and radiation responses. *Oncogene*, 22(37):5774–5783, Sep 2003.
- [19] A. M. Femino, F. S. Fay, K. Fogarty, and R. H. Singer. Visualization of single RNA transcripts in situ. *Science*, 280(5363):585–590, Apr 1998.
- [20] D. J. Freeman, A. G. Li, G. Wei, H. H. Li, N. Kertesz, R. Lesche, A. D. Whale, H. Martinez-Diaz, N. Rozengurt, R. D. Cardiff, X. Liu, and H. Wu. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*, 3(2):117–130, Feb 2003.
- [21] K. Fujarewicz, M. Kimmel, T. Lipniacki, and A. Swierniak. Adjoint systems for models of cell signaling pathways and their application to parameter fitting. *IEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform*, 4(3):322–335, 2007.
- [22] S. Fujioka, C. Schmidt, G. M. Sclabas, Z. Li, H. Pelicano, B. Peng, A. Yao, J. Niu, W. Zhang, D. B. Evans, J. L. Abbruzzese, P. Huang, and P. J. Chiao. Stabilization of p53 is a novel mechanism for proapoptotic function of NF-kappaB. *J Biol Chem*, 279(26):27549–27559, Jun 2004.
- [23] J. M. Garcia, J. Silva, C. Pena, V. Garcia, R. Rodriguez, M. A. Cruz, B. Cantos, M. Provencio, P. Espana, and F. Bonilla. Promoter methylation of the PTEN gene is a

- common molecular change in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*, 41(2):117–124, Oct 2004.
- [24] N. Geva-Zatorsky, N. Rosenfeld, S. Itzkovitz, R. Milo, A. Sigal, E. Dekel, T. Yarnitzky, Y. Liron, P. Polak, G. Lahav, and U. Alon. Oscillations and variability in the p53 system. *Mol Syst Biol*, 2:2006.0033, 2006.
- [25] D. T. Gillespie. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *The Journal of Physical Chemistry*, 81:2340–2361, 1977.
- [26] D. T. Gillespie. Approximate accelerated stochastic simulation of chemically reacting systems. *Journal of Chemical Physics*, 115:1716–1733, 2001.
- [27] T. M. Gottlieb, J. Fernando Martinez Leal, R. Seger, Y. Taya, and M. Oren. Crosstalk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 21(8):1299–1303, Feb 2002.
- [28] M. Grell, H. Wajant, G. Zimmermann, and P. Scheurich. The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(2):570–575, Jan 1998.
- [29] S. L. Harris and A. J. Levine. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17):2899–2908, Apr 2005.
- [30] E. L. Haseltine and J. B. Rawlings. Approximate simulation of coupled fast and slow reactions for stochastic chemical kinetics. *J. Chem. Phys.*, 117:6959–6969, 2002.
- [31] B. Hat, K. Puszyński, and T. Lipniacki. Exploring mechanisms of oscillations in p53 and NF-kappaB systems. *IET Systems Biology*, - wstępnie przyjęty do druku.
- [32] Y. Haupt, R. Maya, A. Kazaz, and M. Oren. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630):296–299, May 1997.
- [33] A. V. Hill. The possible effect of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *Proceedings of the Physiological Society*, 1:4–7, 1910.
- [34] A. Hoffmann, A. Levchenko, M. L. Scott, and D. Baltimore. The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science*, 298(5596):1241–1245, Nov 2002.
- [35] W. C. Huang, T. K. Ju, M. C. Hung, and C. C. Chen. Phosphorylation of CBP by IKKalpha promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF-kappaB. *Mol Cell*, 26(1):75–87, Apr 2007.
- [36] A. Ikeda, X. Sun, Y. Li, Y. Zhang, R. Eckner, T. S. Doi, T. Takahashi, Y. Obata, K. Yoshioka, and K. Yamamoto. p300/CBP-dependent and -independent transcriptional interference between NF-kappaB RelA and p53. *Biochem Biophys Res Commun*, 272(2):375–379, Jun 2000.
- [37] Y. A. Ioannou and F. W. Chen. Quantitation of DNA fragmentation in apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 24(5):992–993, Mar 1996.

- [38] S. J. Jeong, C. A. Pise-Masison, M. F. Radonovich, H. U. Park, and J. N. Brady. A novel NF-kappaB pathway involving IKKbeta and p65/RelA Ser-536 phosphorylation results in p53 inhibition in the absence of NF-kappaB transcriptional activity. *J Biol Chem*, 280(11):10326–10332, Mar 2005.
- [39] Z. Jin and W. S. El-Deiry. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4(2):139–163, Feb 2005.
- [40] M. Kaern, T. C. Elston, W. J. Blake, and J. J. Collins. Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nat Rev Genet*, 6(6):451–464, Jun 2005.
- [41] M. Karin. The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 274(39):27339–27342, Sep 1999.
- [42] K. Kawauchi, K. Araki, K. Tobiume, and N. Tanaka. Activated p53 induces NF-kappaB DNA binding but suppresses its transcriptional activation. *Biochem Biophys Res Commun*, 372(1):137–141, Jul 2008.
- [43] J. D. Kearns, S. B., S. L. Werner, C. S. Huang, and A. Hoffmann. IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. *J Cell Biol*, 173(5):659–664, Jun 2006.
- [44] T. B. Kepler and T. C. Elston. Stochasticity in transcriptional regulation: origins, consequences, and mathematical representations. *Biophys J*, 81(6):3116–3136, Dec 2001.
- [45] S. J. Kim, S. G. Hwang, D. Y. Shin, S. S. Kang, and J. S. Chun. p38 kinase regulates nitric oxide-induced apoptosis of articular chondrocytes by accumulating p53 via NFkappa B-dependent transcription and stabilization by serine 15 phosphorylation. *J Biol Chem*, 277(36):33501–33508, Sep 2002.
- [46] M. S. Ko. A stochastic model for gene induction. *J Theor Biol*, 153(2):181–194, Nov 1991.
- [47] B. Krawczyk, K. Rudnicka, and K. Fabianowska-Majewska. The effects of nucleoside analogues on promoter methylation of selected tumor suppressor genes in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 26(8-9):1043–1046, 2007.
- [48] A. Krikos, C. D. Laherty, and V. M. Dixit. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem*, 267(25):17971–17976, Sep 1992.
- [49] G. Lahav, N. Rosenfeld, A. Sigal, N. Geva-Zatorsky, A. J. Levine, M. B. Elowitz, and U. Alon. Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nat Genet*, 36(2):147–150, Feb 2004.
- [50] M. Löbrich, B. Rydberg, and P. K. Cooper. Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific Not I restriction fragments in human fibroblasts: joining of correct and incorrect ends. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(26):12050–12054, Dec 1995.

- [51] E. G. Lee, D. L. Boone, S. Chai, S. L. Libby, M. Chien, J. P. Lodolce, and A. Ma. Failure to regulate TNF-induced NF-kappaB and cell death responses in A20-deficient mice. *Science*, 289(5488):2350–2354, Sep 2000.
- [52] B. Levin. *Genes*. Oxford University Press, 2000.
- [53] T. Lipniacki and M. Kimmel. Deterministic and stochastic models of NF-kappaB pathway. *Cardiovasc Toxicol*, 7(4):215–234, 2007.
- [54] T. Lipniacki, P. Paszek, A. R. Brasier, B. A. Luxon, and M. Kimmel. Mathematical model of NF-kappaB regulatory module. *J Theor Biol*, 228(2):195–215, May 2004.
- [55] T. Lipniacki, P. Paszek, A. R. Brasier, B. A. Luxon, and M. Kimmel. Stochastic regulation in early immune response. *Biophys J*, 90(3):725–742, Feb 2006.
- [56] T. Lipniacki, K. Puszyński, P. Paszek, A. R. Brasier, and M. Kimmel. Single TNFalpha trimers mediating NF-kappaB activation: stochastic robustness of NF-kappaB signaling. *BMC Bioinformatics*, 8:376, 2007.
- [57] X. Liu, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89(2):175–184, Apr 1997.
- [58] L. Ma, J. Wagner, J. J. Rice, W. Hu, A. J. Levine, and G. A. Stolovitzky. A plausible model for the digital response of p53 to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(40):14266–14271, Oct 2005.
- [59] L. D. Mayo and D. B. Donner. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20):11598–11603, Sep 2001.
- [60] L. D Mayo and D. B Donner. The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem Sci*, 27(9):462–467, Sep 2002.
- [61] D. W. Meek. Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell Signal*, 10(3):159–166, Mar 1998.
- [62] D. W. Meek and D. M. Milne. Analysis of multisite phosphorylation of the p53 tumor-suppressor protein by tryptic phosphopeptide mapping. *Methods Mol Biol*, 99:447–463, 2000.
- [63] E. Meulmeester, Y. Pereg, Y. Shiloh, and A. G. Jochemsen. ATM-mediated phosphorylations inhibit Mdmx/Mdm2 stabilization by HAUSP in favor of p53 activation. *Cell Cycle*, 4(9):1166–1170, Sep 2005.
- [64] D. Michael and M. Oren. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol*, 13(1):49–58, Feb 2003.
- [65] L. Michaelis and M. Menten. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem*, 49:333–369, 1913.
- [66] S. Nagata. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, 256(1):12–18, Apr 2000.

- [67] K. Nakano and K. H. Vousden. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7(3):683–694, Mar 2001.
- [68] D. E. Nelson, A. E C Ihekweba, M. Elliott, J. R. Johnson, C. A. Gibney, B. E. Foreman, G. Nelson, V. See, C. A. Horton, D. G. Spiller, S. W. Edwards, H. P. McDowell, J. F. Unitt, E. Sullivan, R. Grimley, N. Benson, D. Broomhead, D. B. Kell, and M. R H White. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science*, 306(5696):704–708, Oct 2004.
- [69] C. W. Nho and P. J. O’Dwyer. NF-kappaB activation by the chemopreventive dithiolethione oltipraz is exerted through stimulation of MEKK3 signaling. *J Biol Chem*, 279(25):26019–26027, Jun 2004.
- [70] C. D. Nicholls, K. G. McLure, M. A. Shields, and P. W. K. Lee. Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. implications on the dominant negative effect. *J Biol Chem*, 277(15):12937–12945, Apr 2002.
- [71] P. Paszek. Modeling stochasticity in gene regulation: characterization in the terms of the underlying distribution function. *Bull Math Biol*, 69(5):1567–1601, Jul 2007.
- [72] N. D. Perkins and T. D. Gilmore. Good cop, bad cop: the different faces of NF-kappaB. *Cell Death Differ*, 13(5):759–772, May 2006.
- [73] N. D. Perkins. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol*, 14(2):64–69, Feb 2004.
- [74] N. D. Perkins. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1):49–62, Jan 2007.
- [75] Y. Pommier, O. Sordet, S. Antony, R. L. Hayward, and K. W. Kohn. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*, 23(16):2934–2949, Apr 2004.
- [76] K. Puszyński, B. Hat, and T. Lipniacki. Oscillations and bistability in the stochastic model of p53 regulation. *J Theor Biol*, 254(2):452–465, Sep 2008.
- [77] K. Puszyński, R. Bertolusso and T. Lipniacki. Crosstalk between p53 and NF-kappaB systems: pro- and anti-apoptotic functions of NF-kappaB. *IET Systems Biology*, - wstępnie przyjęty do druku.
- [78] A. Raj, C. S. Peskin, D. Tranchina, D. Y. Vargas, and S. Tyagi. Stochastic mRNA synthesis in mammalian cells. *PLoS Biol*, 4(10):e309, Oct 2006.
- [79] K. Rothkamm and M. Löbrich. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9):5057–5062, Apr 2003.
- [80] K. M. Ryan, M. K. Ernst, N. R. Rice, and K. H. Vousden. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature*, 404(6780):892–897, Apr 2000.

- [81] B. Schomer-Miller, T. Higashimoto, Y. K. Lee, and E. Zandi. Regulation of IkappaB kinase (IKK) complex by IKKgamma-dependent phosphorylation of the T-loop and C terminus of IKKbeta. *J Biol Chem*, 281(22):15268–15276, Jun 2006.
- [82] J. H. Shim, C. Xiao, A. E. Paschal, S. T. Bailey, P. Rao, M. S. Hayden, K. Y. Lee, C. Bussey, M. Steckel, N. Tanaka, G. Yamada, S. Akira, K. Matsumoto, and S. Ghosh. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes Dev*, 19(22):2668–2681, Nov 2005.
- [83] B. Singh, P. G. Reddy, A. Goberdhan, C. Walsh, S. Dao, I. Ngai, T. C. Chou, P. O-Charoenrat, A. J. Levine, P. H. Rao, and A. Stoffel. p53 regulates cell survival by inhibiting PIK3CA in squamous cell carcinomas. *Genes Dev*, 16(8):984–993, Apr 2002.
- [84] V. Stambolic, D. MacPherson, D. Sas, Y. Lin, B. Snow, Y. Jang, S. Benchimol, and T. W. Mak. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*, 8(2):317–325, Aug 2001.
- [85] J. M. Stommel and G. M. Wahl. Accelerated Mdm2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *EMBO J*, 23(7):1547–1556, Apr 2004.
- [86] J. M. Stommel and G. M. Wahl. A new twist in the feedback loop: stress-activated Mdm2 destabilization is required for p53 activation. *Cell Cycle*, 4(3):411–417, Mar 2005.
- [87] S. C. Sun, P. A. Ganchi, D. W. Ballard, and W. C. Greene. NF-kappaB controls expression of inhibitor IkappaBalpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science*, 259(5103):1912–1915, Mar 1993.
- [88] K. Szoltysek, K. Pietranek, M. Kalinowska-Herok, M. Pietrowska, M. Kimmel, and P. Widlak. TNFalpha-induced activation of NF-kappaB protects against UV-induced apoptosis specifically in p53-proficient cells. *Acta Biochim Pol*, 55(4):741–748, 2008.
- [89] G. Takaesu, R. M. Surabhi, K. J. Park, J. Ninomiya-Tsuji, K. Matsumoto, and R. B. Gaynor. TAK1 is critical for IkappaB kinase-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Mol Biol*, 326(1):105–115, Feb 2003.
- [90] B. Vogelstein, D. Lane, and A. J. Levine. Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810):307–310, Nov 2000.
- [91] K. H. Vousden and D. P. Lane. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(4):275–283, Apr 2007.
- [92] P. Waage and C. M. Guldberg. Videnskabs-Selskabet i Christiania. *Forhandlinger*, 35:–, 1864.
- [93] R. Wadgaonkar, K. M. Phelps, Z. Haque, A. J. Williams, E. S. Silverman, and T. Collins. CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor-kappaB and p53 signaling. *J Biol Chem*, 274(4):1879–1882, Jan 1999.

- [94] J. Wagner, L. Ma, J. J. Rice, W. Hu, A. J. Levine, and G. A. Stolovitzky. p53-Mdm2 loop controlled by a balance of its feedback strength and effective dampening using ATM and delayed feedback. *Syst Biol (Stevenage)*, 152(3):109–118, Sep 2005.
- [95] M. C. Walters, S. Fiering, J. Eidemiller, W. Magis, M. Groudine, and D. I. Martin. Enhancers increase the probability but not the level of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(15):7125–7129, Jul 1995.
- [96] G. A. Webster and N. D. Perkins. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol*, 19(5):3485–3495, May 1999.
- [97] K. B. Wee and B. D. Aguda. Akt versus p53 in a network of oncogenes and tumor suppressor genes regulating cell survival and death. *Biophys J*, 91(3):857–865, Aug 2006.
- [98] K. B. Wee, U. Surana, and B. D. Aguda. Oscillations of the p53-Akt network: implications on cell survival and death. *PLoS ONE*, 4(2):e4407, 2009.
- [99] R. L. Weinberg, D. B. Veprintsev, and A. R. Fersht. Cooperative binding of tetrameric p53 to DNA. *J Mol Biol*, 341(5):1145–1159, Aug 2004.
- [100] S. L. Werner, D. Barken, and A. Hoffmann. Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. *Science*, 309(5742):1857–1861, Sep 2005.
- [101] S. L. Werner, J. D. Kearns, V. Zadorozhnaya, C. Lynch, E. O’Dea, M. P. Boldin, A. Ma, D. Baltimore, and A. Hoffmann. Encoding NF-kappaB temporal control in response to TNF: distinct roles for the negative regulators IkappaBalph and A20. *Genes Dev*, 22(15):2093–2101, Aug 2008.
- [102] 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, and V. M. Dixit. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, 430(7000):694–699, Aug 2004.
- [103] H. Wu and G. Lozano. NF-kappaB activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem*, 269(31):20067–20074, Aug 1994.
- [104] L. Yang, K. Ross, and E. E. Qwarnstrom. RelA control of IkappaBalph phosphorylation: a positive feedback loop for high affinity NF-kappaB complexes. *J Biol Chem*, 278(33):30881–30888, Aug 2003.
- [105] S. Q. Zhang, A. Kovalenko, G. Cantarella, and D. Wallach. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to nemo (IKKgamm) upon receptor stimulation. *Immunity*, 12(3):301–311, Mar 2000.
- [106] T. Zhang, P. Brazhnik, and J. J. Tyson. Exploring mechanisms of the DNA-damage response: p53 pulses and their possible relevance to apoptosis. *Cell Cycle*, 6(1):85–94, Jan 2007.

-
- [107] B. P. Zhou, Y. Liao, W. Xia, Y. Zou, B. Spohn, and M. C. Hung. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated Mdm2 phosphorylation. *Nat Cell Biol*, 3(11):973–982, Nov 2001.