

Małgorzata KARDYŃSKA
Politechnika Śląska

ANALIZA WRAŻLIWOŚCI MODELU cGAS–STING Z UWZGLĘDNIENIEM STOCHASTYCZNYCH PRZEŁĄCZEŃ GENÓW

Streszczenie. W pracy przeprowadzono globalną analizę wrażliwości modelu szlaku cGAS–STING z wykorzystaniem indeksów Sobola oraz metody OAT, obejmującą szeroki zakres zmian parametrów. Porównano wyniki dla wariantu deterministycznego i modelu ze stochastycznymi przełączaniami genów. Dodatkowo wykonano analizę ukierunkowaną na identyfikację potencjalnych celów molekularnych z wykorzystaniem losowego próbkowania parametrów symulującego działanie leku. Zidentyfikowane cele potwierdzają wyniki dostępne w literaturze.

SENSITIVITY ANALYSIS OF THE cGAS–STING MODEL WITH STOCHASTIC GENE SWITCHING

Summary. In this study, a global sensitivity analysis of the cGAS–STING signaling pathway model was performed using Sobol indices and OAT analysis over a wide range of parameter variations. The results were compared for the deterministic model and the model with stochastic gene switching. Additionally, a drug-target-oriented sensitivity analysis was conducted using random parameter sampling to mimic the effect of pharmacological intervention on the signaling pathway. The identified targets are consistent with those reported in the literature.

1. Wprowadzenie

Kluczową rolę w ludzkiej odporności wrodzonej odgrywają receptory rozpoznające wzorce (PRR). Jednym z silnych aktywatorów wrodzonego układu odpornościowego jest cytoplazmatyczne DNA. W komórkach dzielących się DNA zlokalizowane jest w mitochondriach oraz w jądrze komórkowym. Nagromadzenie DNA w cytoplazmie może wynikać z obecności patogenu (DNA wirusowego lub bakteryjnego) lub z zaburzeń stabilności organelli. Kluczowym sensorem cytoplazmatycznego DNA jest białko cGAS (syntaza cyklicznego GMP–AMP) [1].

Aktywacja cGAS przez dwuniciowe DNA (dsDNA) uruchamia szlak cGAS–STING i prowadzi do produkcji IFN- β . Interferon ten aktywuje szlak JAK–STAT, który indukuje ekspresję genów stymulowanych interferonem (ISG), w tym TREX1 kodującego egz nukleazę degradującą cytoplazmatyczne DNA. TREX1 pełni funkcję negatywnego regulatora szlaku cGAS–STING poprzez ograniczanie dalszej aktywacji cGAS [1].

Szlak cGAS–STING jest kluczowym elementem odporności wrodzonej, a je-

go zaburzenia regulacji prowadzą do nieprawidłowej odpowiedzi immunologicznej oraz przewlekłego stanu zapalnego. Przykładem takiej patologii jest zespół Aicardiego–Goutièresa (AGS) [2], w którym dysfunkcja TREX1 skutkuje podwyższoną produkcją interferonów i utrzymującą się odpowiedzią zapalną.

Biorąc pod uwagę istotną rolę szlaku cGAS–STING w regulacji odpowiedzi immunologicznej, w pracy przeprowadzono analizę wrażliwości jego modelu z wykorzystaniem metody Sobola oraz analizy OAT (ang. *one-at-a-time*). W celu identyfikacji kluczowych komponentów szlaku badaniu poddano zarówno model deterministyczny, jak i model z losowymi przełączeniami genów. Dodatkowo wykonano analizę wrażliwości ukierunkowaną na poszukiwanie potencjalnych celów molekularnych dla leków w zmodyfikowanym modelu cGAS–STING z wyłączoną pętlą TREX1, co pozwoliło na odwzorowanie warunków charakterystycznych dla choroby Aicardiego–Goutièresa (AGS).

2. Metody

2.1. Model szlaku sygnałowego cGAS–STING

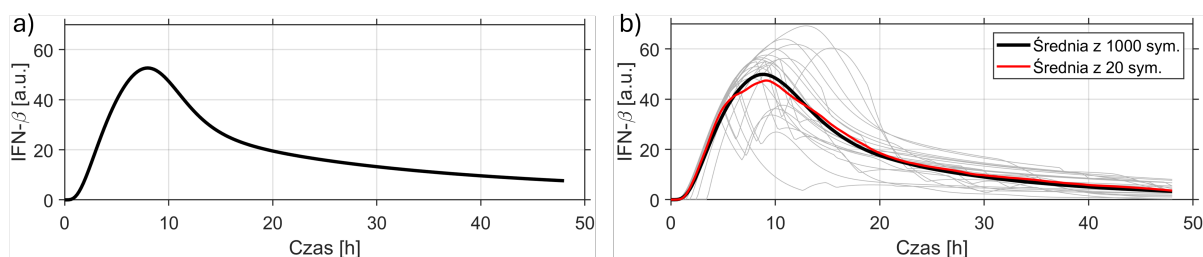
W pracy wykorzystano opublikowany w literaturze model szlaku sygnałowego cGAS–STING [3], opisujący uproszczony mechanizm wykrywania cytoplazmatycznego DNA i inicjacji odpowiedzi interferonowej. Oryginalny model obejmuje 13 równań różniczkowych zwyczajnych i 33 parametry, których strukturę oraz wartości przyjęto bez zmian na podstawie pracy źródłowej [3]. Zmienne modelu reprezentują stężenia białek i transkryptów wyrażone w jednostkach arbitralnych.

Następnie model zmodyfikowano, wprowadzając stochastyczne przełączanie stanów genów w sposób dyskretny w czasie, jako aproksymację procesu Markowa. W tym celu stworzono model hybrydowy, w którym dynamikę transkrypcji czterech genów ($\text{IFN-}\beta_m$, SOCS_m , IRF7_m oraz TREX1_m) uzależniono od dyskretnych stanów ich promotorów. Człony odpowiedzialne za syntezę mRNA w odpowiednich równaniach różniczkowych zostały pomnożone przez zmienne binarne (0 lub 1): odpowiednio G_{IFN} , G_{SOCS} , G_{IRF7} oraz G_{TREX1} (reprezentujące stan aktywności danego genu).

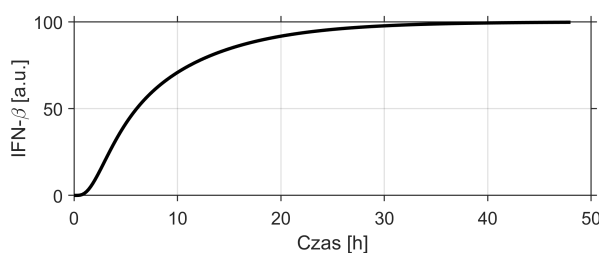
Wartości tych zmiennych są aktualizowane w dyskretnych krokach czasu Δt . W każdym kroku prawdopodobieństwo zmiany stanu genu wyznaczane jest analitycznie: dla genu wyłączonego ($G_i = 0$) prawdopodobieństwo jego aktywacji wynosi $1 - e^{-k_{\text{on},i} \cdot \Delta t}$, natomiast dla genu włączonego ($G_i = 1$) prawdopodobieństwo inaktywacji wynosi $1 - e^{-k_{\text{off},i} \cdot \Delta t}$. Parametry $k_{\text{on},i}$ oraz $k_{\text{off},i}$ dla i -tego genu dobrano w taki sposób, aby średnia odpowiedź $\text{IFN-}\beta$ z 1000 symulacji stochastycznych odpowiadała trajektorii uzyskanej w symulacji deterministycznej.

W badanym modelu wejściem jest stężenie DNA w cytoplazmie, natomiast jako wyjście przyjmujemy odpowiedź $\text{IFN-}\beta$. Przykładowe przebiegi dla modelu deterministycznego i stochastycznego przedstawiono na rysunku 1.

Dodatkowo w części badań wykorzystano model z wyłączoną pętlą ujemnego sprzężenia zwrotnego zależną od TREX1, co zrealizowano poprzez ustawienie parametru $k_{\text{cat}2} = 0$. Odpowiedź zmodyfikowanego modelu przedstawiono na rysunku 2. W odróżnieniu od modelu referencyjnego, po początkowym wzroście stężenie $\text{IFN-}\beta$ utrzymuje się na wysokim, stałym poziomie, co odpowiada przewlekłemu stanowi zapalnemu.



Rys. 1. Porównanie odpowiedzi modelu (a) deterministycznego i (b) stochastycznego



Rys. 2. Odpowiedź modelu deterministycznego z wyłączoną pętlą TREX1.

2.2. Analiza wrażliwości

Modele opisane w poprzednim podrozdziale poddano analizie wrażliwości na zmiany parametrów. Wykorzystano dwa podejścia: lokalną analizę OAT, polegającą na perturbacji pojedynczych parametrów w szerokim zakresie ich zmienności [4], oraz globalną analizę wrażliwości opartą na indeksach Sobola (pierwszego rzędu i całkowitych), wyznaczonych z wykorzystaniem algorytmu próbkowania Saltella [6, 5]. W obu podejściach wartości parametrów losowano z rozkładu jednostajnego w zakresie $\pm 50\%$ wartości nominalnych, natomiast zmiany $\text{IFN-}\beta$ oceniano za pomocą wskaźnika odchylenia trajektorii zdefiniowanego jako norma L_2 różnicy sygnałów:

$$E = \sqrt{\int_{t_0}^{t_k} (y(t) - y_{ref}(t))^2 dt} \quad (1)$$

gdzie $y(t)$ oznacza przebieg $\text{IFN-}\beta$ dla zmienionego zestawu parametrów, a $y_{ref}(t)$ stanowi przebieg referencyjny. W przypadku modelu deterministycznego jako $y_{ref}(t)$ przyjmuje się przebieg $\text{IFN-}\beta$ uzyskany dla nominalnego zestawu parametrów. W wariancie ze stochastycznymi przełączeniami genów funkcję przebiegu referencyjnego pełni średnia z 1000 symulacji stochastycznych, w których losowość wynika wyłącznie z procesów przełączeń genów.

W przypadku modelu stochastycznego losowość odpowiedzi wynika zarówno z próbkowania parametrów, jak i ze stochastycznych przełączeń stanów genów. Głównym celem analizy jest ocena wpływu niepewności parametrów, natomiast losowość przełączeń traktowana jest jako szum wewnętrzny. W analizie modeli stochastycznych istotne jest rozróżnienie tych dwóch źródeł zmienności, ponieważ mogą one zaburzać wyznaczane miary wrażliwości [6, 5]. W celu ograniczenia wpływu szumu dla każdego zestawu parametrów wykonywano uśrednianie wyników z 20 niezależnych symulacji, co pozwala na minimalizację jego wpływu na wyznaczane rankingi wrażliwości przy akceptowalnym koszcie obliczeniowym.

Dla zastosowanych metod przeprowadzono analizę zbieżności wskaźników wrażliwości.

liwości w funkcji liczby próbek. W przypadku analizy OAT stabilizacja wyników występowała przy mniej niż 1000 symulacji dla każdego parametru. W metodzie Sobola licznosc macierzy próbkowania A i B ustalono na poziomie 5000, natomiast całkowita liczba ewaluacji modelu była wyższa ze względu na konieczność generowania dodatkowych kombinacji parametrów zgodnie z procedurą Saltellego [5].

Ostatnim podejściem była metoda ukierunkowana na identyfikację celów molekularnych dla leków [4]. Polega ona na redukcji wartości parametrów kinetycznych w celu symulacji działania inhibitora. Aby uwzględnić zmienność odpowiedzi komórkowych, stopień redukcji losowano z rozkładu log-normalnego. Jako miarę wrażliwości wykorzystano zmianę pola pod krzywą odpowiedzi modelu względem przebiegu referencyjnego:

$$A_i = \frac{\int_{t_0}^{t_k} \Delta y_i(t) dt}{\int_{t_0}^{t_k} y_{ref}(t) dt} \quad (2)$$

gdzie $\Delta y_i(t) = y_i(t) - y_{ref}(t)$ oznacza odchylenie odpowiedzi modelu wywołane zaburzeniem i -tego parametru, uśrednione po wszystkich symulacjach z zaburzonym i -tym parametrem [4].

3. Wyniki i dyskusja

W sekcji tej zamieszczono wyniki analizy wrażliwości podstawowego modelu deterministycznego [3] oraz jego zmodyfikowanej wersji z losowymi przełączeniami genów, przeprowadzonej z wykorzystaniem metod OAT oraz Sobola. Dodatkowo wykorzystano metodę ukierunkowaną na poszukiwanie celów molekularnych dla leków do modelu cGAS–STING z wyłączoną pętlą TREX1. Wyniki przedstawiono w postaci rankingów parametrów. Wyniki przedstawiono w postaci rankingów parametrów. Dla zwiększenia czytelności na osi x zastosowano indeksy zamiast pełnych nazw parametrów, których opis umieszczono w tabeli 1.

3.1. Analiza modelu deterministycznego

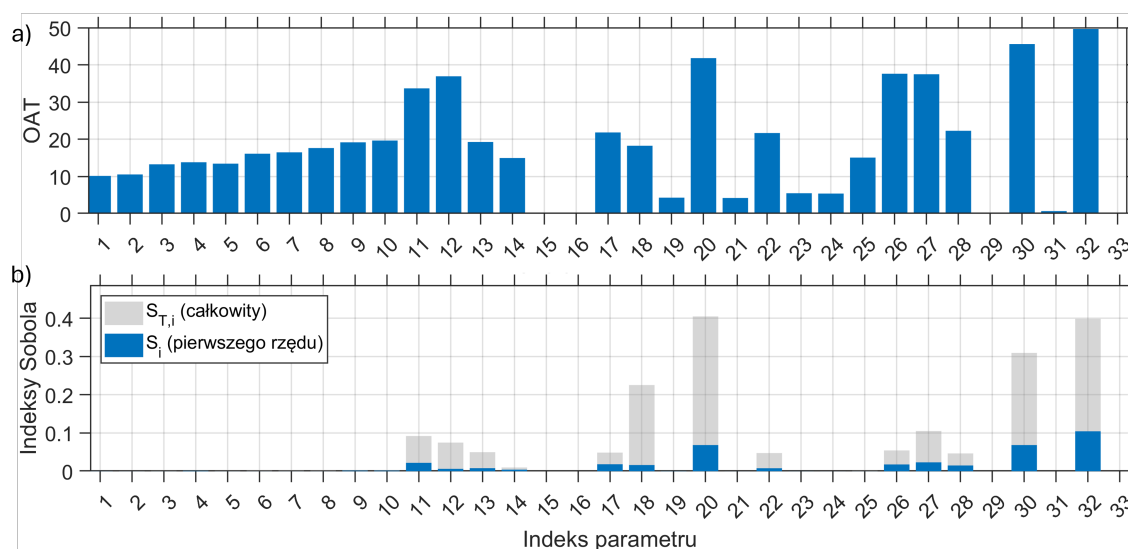
Na rysunku 3 przedstawiono rankingi parametrów modelu deterministycznego. Wyniki uzyskane różnymi metodami różnią się, jednak w obu rankingach najwyższą istotność wykazują parametry związane z czynnikiem transkrypcyjnym IRF7 (degradacja IRF7 i IRF7m oraz synteza IRF7). Wysokie wartości wrażliwości uzyskano również dla parametrów związanych z syntezą i degradacją IFN β , które bezpośrednio determinują jego poziom wyjściowy. Najniżej w rankingu znajdują się parametry SOCS i TREX1, co wskazuje na niską wrażliwość modelu na ich zmiany. Jest to zgodne z wynikami symulacyjnymi w pracy [3], gdzie zmiany $k_{cat,2}$ powodowały jedynie niewielkie zmiany odpowiedzi, a jakościowo różny przebieg IFN β uzyskano dopiero po całkowitym wyłączeniu degradacji DNA zależnej od TREX1 ($k_{cat,2} = 0$).

Interesujące są różnice dotyczące parametrów związanych z wczesną fazą odpowiedzi komórkowej (wykrywaniem dsDNA w cytoplazmie, tworzeniem i rozpadem kompleksów oraz aktywacją czynników transkrypcyjnych), które zajmują relatywnie wysokie pozycje w rankingu OAT, a niskie w rankingu Sobola. Parametry te wpływają głównie na przebiegi przejściowe, przy niewielkim wpływie na stan ustalony. Przykład odpowiedzi IFN β dla różnych wartości parametru k_{1f} przedstawiono na rysunku 4. Różnice w rankingach mogą wynikać z różnych miar stosowanych w metodach: w OAT

Tabela 1

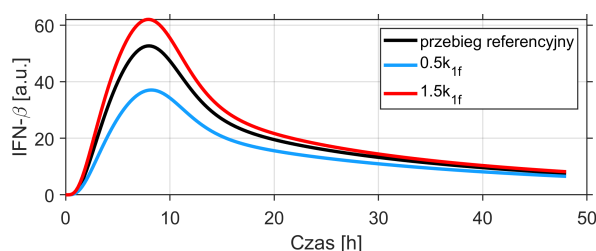
Parametry modelu cGAS-STING

Lp.	Sym.	Opis	Lp.	Sym.	Opis
1	k_{1f}	asocj. cGAS-DNA	18	k_{10f2}	synt. IRF7m zal. od IRF7
2	k_{1r}	dysocj. cGAS-DNA	19	k_{11f}	synteza TREX1m
3	k_{3f}	asocj. cGAMP-STING	20	k_{12f}	synteza IRF7
4	k_{3r}	dysocj. cGAMP-STING	21	k_{13f}	synteza TREX1
5	k_{4f}	synteza cGAMP	22	k_{6f}	synteza IFN β m
6	$k_{cat,5}$	aktywacja IRF3	23	$k_{cat,2}$	deg. DNA zal. od TREX1
7	$K_{m,5}$	stała M-M IRF3	24	$K_{m,2}$	stała M-M DNA
8	k_{5r}	dezaktywacja IRF3	25	τ_4	degradacja cGAMP
9	$k_{cat,6}$	synteza IFN β m	26	τ_6	degradacja IFN β m
10	$K_{m,6}$	stała M-M IFN β m	27	τ_7	degradacja IFN β
11	$k_{cat,7}$	synteza IFN β	28	τ_8	degradacja STAT
12	$K_{m,7}$	stała M-M IFN β	29	τ_9	degradacja SOCSm
13	$k_{cat,8}$	aktywacja STAT	30	τ_{10}	degradacja IRF7m
14	$K_{m,8}$	stała M-M STAT	31	τ_{11}	degradacja TREX1m
15	k_{8f}	inhibicja SOCS	32	τ_{12}	degradacja IRF7
16	k_{9f}	synteza SOCSm	33	τ_{13}	degradacja TREX1
17	k_{10f1}	synteza IRF7m			



Rys. 3. Porównanie rankingów parametrów modelu deterministycznego: (a) metoda OAT, (b) metoda Sobola.

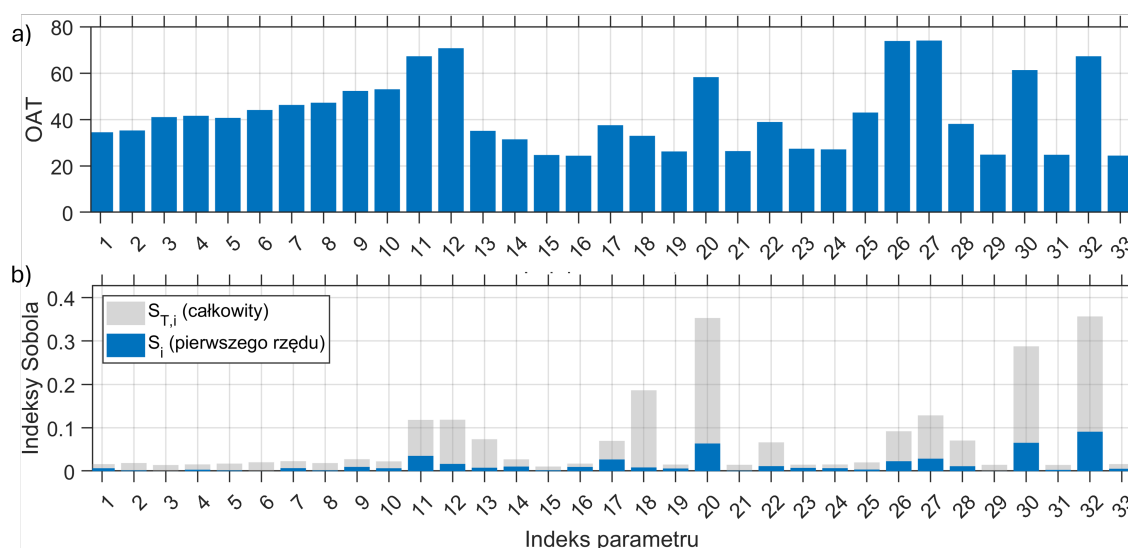
analizowany jest dystans między przebiegiem po perturbacji a referencyjnym, natomiast w metodzie Sobola wariancja tego dystansu. Dodatkowo w metodzie Sobola uwzględniana jest wariancja całkowita V_Y , wyznaczana przy jednoczesnej zmianie wszystkich parametrów, co powoduje dominację parametrów o największym wpływie i może marginalizować wpływ innych parametrów. W konsekwencji indeksy Sobola dla tych parametrów pozostają niewielkie (ale niezerowe), mimo że ich wpływ jest widoczny lokalnie.



Rys. 4. Porównanie odpowiedzi modelu deterministycznego dla różnych wartości parametru k_{1f} .

3.2. Wpływ stochastycznych przełączeń genów na wyniki analizy wrażliwości

Kolejnym etapem badań było sprawdzenie wpływu stochastycznych przełączeń genów na wyniki analizy wrażliwości (rys. 5). W metodzie Sobola odnotowano znikomy wpływ modyfikacji modelu, co dowodzi jej odporności na szum wewnętrzny. Wynika to z faktu, że zmiany wywołane losowością przełączeń są niewielkie w porównaniu z wariancją generowaną przez jednoczesną perturbację wszystkich parametrów. W analizie OAT zaobserwowano odmienną sytuację – wartości wskaźników dla całego zbioru parametrów uległy równomiernemu podwyższeniu. Istotne jest jednak to, że mimo wzrostu wartości bezwzględnych, relatywny ranking (kolejność) parametrów nie uległ zmianie. Wyniki z metody OAT są zatem nadal użyteczne w kontekście identyfikacji parametrów kluczowych, choć należy uwzględnić stałe przesunięcie ich wartości wywołane wewnętrzną losowością modelu.

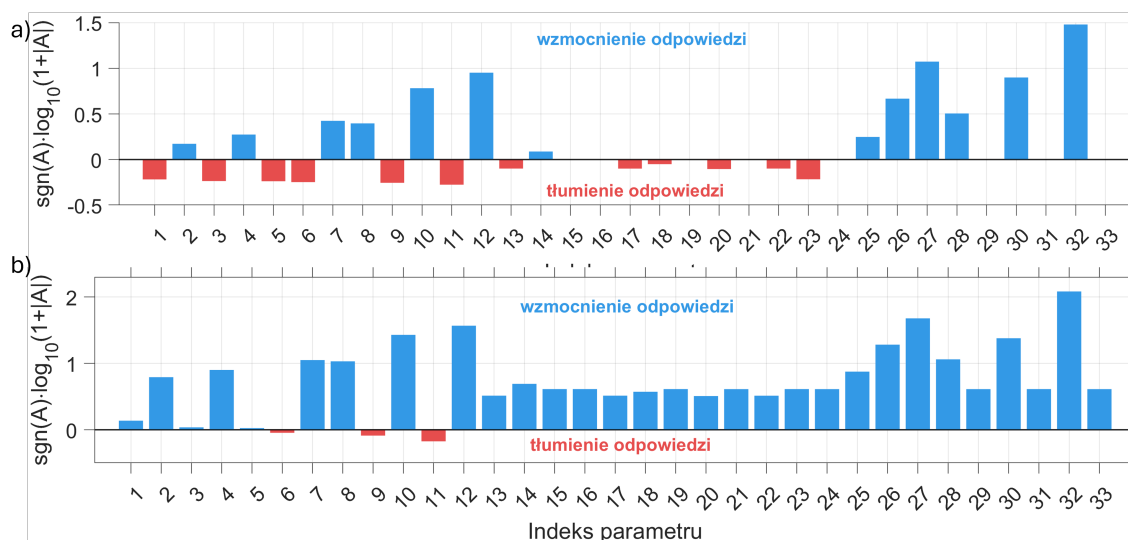


Rys. 5. Porównanie rankingów parametrów modelu stochastycznego: (a) metoda OAT, (b) metoda Sobola.

3.3. Analiza wrażliwości pod kątem poszukiwania celów molekularnych dla leków

Ostatnim etapem badań było zastosowanie autorskiej metody analizy wrażliwości, zaprojektowanej do badania wpływu potencjalnych terapii farmakologicznych. W tej części analizy zrezygnowano z wykorzystania metody Sobola gdyż algorytm Sobola opiera się na symetrycznym próbkowaniu przestrzeni wokół punktu nominalnego, co w kontekście protokołów terapeutycznych pozbawione jest uzasadnienia. Zapropro-

nowaną metodę wykorzystano do analizy modelu z wyłączoną pętlą ujemnego sprzężenia zwrotnego zależną od TREX1, co pozwala na odzwierciedlenie stanu patologicznego w zespole Aicardiego-Goutièresa (AGS). Usunięcie aktywności TREX1 prowadzi do przewlekłej stymulacji ścieżki cGAS-STING przez endogenne DNA, co skutkuje stałą, nadmierną produkcją interferonów typu I (rys. 2).



Rys. 6. Rankingi parametrów uzyskane metodą OAT dla modelu z wyłączoną pętlą TREX: (a) model deterministyczny, (b) model stochastyczny.

Uzyskane wyniki przedstawiono w przesuniętej skali logarytmicznej (rys. 6). Podczas gdy wytłumienie odpowiedzi układu jest ograniczone dolną granicą fizyczną (stężenia nie mogą być ujemne), jej wzmocnienie może być kilkukrotne. Z punktu widzenia terapii kluczowe będzie tłumienie odpowiedzi modelu (słupki czerwone). W wariacie deterministycznym modelu najistotniejsze parametry związane są z wykrywaniem dsDNA w cytoplazmie, tworzeniem kompleksów oraz aktywacją czynników transkrypcyjnych. Ważna okazała się także synteza IFN β oraz jego transkryptu. Zablockowanie transkrypcji i translacji wymaga zastosowania terapii opartych na wyciszaniu genów za pomocą siRNA, natomiast do zablockowania aktywacji szlaku można użyć inhibitorów detekcji cytozolowego dsDNA. To drugie podejście jest już badane — związki RU.365 oraz RU.521 [7] potrafią blokować domenę katalityczną cGAS, uniemożliwiając wiązanie z dsDNA. Ich wysoka skuteczność eksperymentalna w hamowaniu produkcji IFN β potwierdza wyniki analizy wrażliwości.

Podobnie jak wcześniej, w modelu stochastycznym zaobserwowano przesunięcie wskaźników wrażliwości. Szum wewnętrzny wpłynął na wyniki niesymetrycznie – parametry dodatnie uzyskały wyższe wartości, podczas gdy wpływ parametrów ujemnych (tłumiących) uległ redukcji. Taka deformacja stawia pod znakiem zapytania skuteczność stosowania tej metody w modelach stochastycznych, gdyż obecność szumu może zniekształcać ocenę rzeczywistej siły działania potencjalnych inhibitorów.

4. Wnioski

Przeprowadzone badania wykazały, że metoda Sobola jest bardziej odporna na wewnętrzną losowość modelu niż analiza OAT, jednak obie metody pozwalają

na identyfikację parametrów kluczowych dla odpowiedzi układu. W modelu deterministycznym zaobserwowano, że część parametrów wpływających na wczesną fazę odpowiedzi uzyskała bardzo niskie indeksy Sobola, mimo ich zauważalnego wpływu na przebiegi przejściowe, co wynika z dominacji wariancji generowanej przez najsilniej oddziałujące parametry i szerokiej skali wartości wskaźników.

Zastosowanie autorskiej metody OAT umożliwiło identyfikację kluczowych parametrów w modelu z wyłączoną pętlą TREX1, wskazując potencjalne cele dla terapii ukierunkowanych na tłumienie odpowiedzi IFN β . Jednocześnie wyniki dla wariantu stochastycznego wskazały, że obecność szumu może istotnie zaburzać ocenę wrażliwości parametrów, co ogranicza możliwość ich interpretacji i wskazuje na potrzebę dalszego doskonalenia i rozwijania metody.

Praca została sfinansowana ze środków statutowych 02/040/BK_26/1080. W pracy wykorzystano narzędzia oparte na sztucznej inteligencji do edycji tabel i wzorów oraz korekty językowej i gramatycznej tekstu.

LITERATURA

1. Decout A., Katz J. D., Venkatraman S., Ablasser A.: The cgas–sting pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, 2021, Vol.21, p. 548–569.
2. Gray E. E., Treuting P. M., Woodward J. J., Stetson D. B.: Cutting edge: cGAS is required for lethal autoimmune disease in the Trex1-deficient mouse model of Aicardi-Goutieres syndrome. *Journal of Immunology*, 2015, Vol.195, p. 1939–1943.
3. Gregg R. W., Sarkar S. N., Shoemaker J. E.: Mathematical modeling of the cGAS pathway reveals robustness of DNA sensing to TREX1 feedback. *Journal of Theoretical Biology*, 2019, Vol.462, p. 148–157.
4. Kardyńska M., Smieja J., Paszek P., Puzynski K.: Application of sensitivity analysis to discover potential molecular drug targets. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, Vol.23, p. 6604.
5. Saltelli A., Annoni P., Azzini I., Campolongo F., Ratto M., Tarantola S.: Variance based sensitivity analysis of model output. design and estimator for the total sensitivity index. *Computer Physics Communications*, 2010, Vol.181, p. 259–270.
6. Sobol I. M.: Global sensitivity indices for nonlinear mathematical models and their monte carlo estimates. *Mathematics and Computers in Simulation*, 2001, Vol.55, p. 271–280.
7. Vincent J., Adura C., Gao P., et. al : Small molecule inhibition of cgas reduces interferon expression in primary macrophages from autoimmune mice. *Nature Communications*, 2017, Vol.8, p. 750.