

Bogumiła SZUBERT, Mateusz TWARDAWA, Piotr FORMANOWICZ
Politechnika Poznańska

SIECI PETRIEGO A METODY ZNAJADOWANIA MINIMALNYCH ZBIORÓW PREKURSORÓW W PROJEKTOWANIU DOMEN SYGNAŁOWYCH RECEPTORÓW CAR-T*

Streszczenie. Terapie oparte na receptorach chimerycznych (CAR-T) stanowią jeden z najbardziej obiecujących kierunków immunoterapii nowotworowej, a skuteczność i bezpieczeństwo konstruktu w decydującym stopniu zależą od doboru domen sygnałowych. W pracy przedstawiono sieć Petriego modelującą proces aktywacji limfocytu T oraz dwa niezależne podejścia do wsparcia projektowania domen CAR-T na jej podstawie. Pierwsze podejście oparte jest na symulacjach wyłączenia czterech receptorów kostymulujących, natomiast drugie polega na znajdowaniu minimalnych zbiorów prekursorów aktywacji. Zestawienie wyników obu metod pokazuje, że nie stanowią one podejść konkurencyjnych, lecz komplementarne narzędzia analizy tej samej sieci, co wskazuje na konkretne kierunki integracji obu podejść w dalszych pracach i może zaowocować narzędziem wspierającym projektowanie eksperymentalnych receptorów CAR-T.

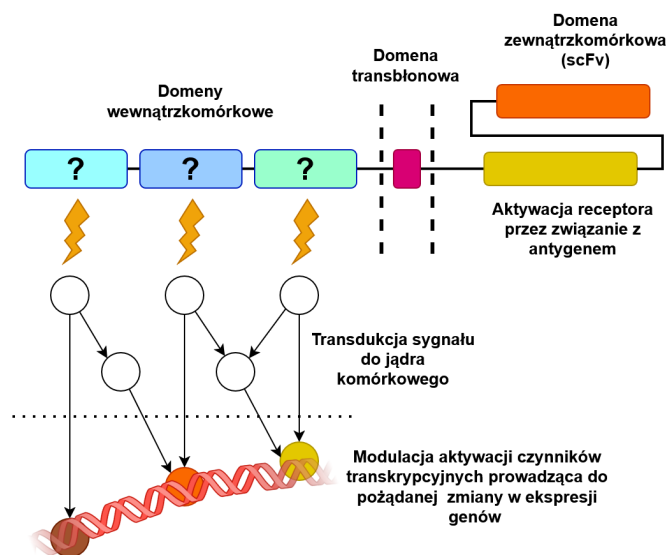
PETRI NETS AND METHODS FOR FINDING MINIMAL PRECURSOR SETS IN CAR-T RECEPTOR SIGNAL DOMAIN DESIGN

Summary. Chimeric antigen receptor (CAR-T) therapies represent one of the most promising directions in cancer immunotherapy, with the efficacy and safety of the construct depending decisively on the selection of signaling domains. This work presents a Petri net modeling the process of T-cell activation, together with two independent approaches to supporting CAR-T domain design based on it. The first approach relies on knockout simulations of four costimulatory receptors, while the second is based on finding minimal precursor sets. A comparison of the results from both methods shows that they are not competing approaches but complementary tools for analyzing the same network, pointing to concrete directions for integrating both approaches in future work, which could eventually result in a tool supporting the design of experimental CAR-T receptors.

*Praca była częściowo sfinansowana ze środków statutowych Politechniki Poznańskiej. Praca była częściowo sfinansowana przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz jest wynikiem współpracy w ramach Klastra Doskonałości Zrównoważonej Biotechnologii Politechniki Poznańskiej.

1. Wprowadzenie

Receptory chimeryczne (ang. *chimeric antigen receptors*, CAR) stanowią jedno z najważniejszych osiągnięć immunoterapii nowotworowej ostatnich dekad [41]. Ich konstrukcja opiera się na połączeniu w jednym białku domeny zewnątrzkomórkowej, odpowiedzialnej za rozpoznanie antygenu docelowego (najczęściej w postaci fragmentu przeciwciała scFv), z domenami wewnątrzkomórkowymi, których zadaniem jest przekazanie sygnału aktywującego do wnętrza limfocyta T, co zostało schematycznie zaprezentowane na rysunku 1. Dzięki takiej architekturze możliwe jest przeprogramowanie wyizolowanych komórek odpornościowych pacjenta tak, aby po powrocie do organizmu rozpoznawały i eliminowały komórki nowotworowe w sposób niezależny od prezentacji antygenu przez główny układ zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*, MHC), co znacząco poszerza spektrum zastosowań terapii komórkowych w porównaniu z klasycznym rozpoznaniem antygenowym przez receptor TCR [6, 41].



Rys. 1. Uproszczony schemat przedstawiający budowę i ideę działania receptora CAR-T. Receptor składa się z trzech części: domeny zewnątrzkomórkowej (scFv), która wiąże wybrany antygen; domeny transbłonowej, która przekazuje sygnał oraz modułowej domeny wewnątrzkomórkowej, która aktywuje kilka różnych szlaków sygnalizacyjnych. Efektem aktywacji receptora jest zmiana profilu ekspresji genów, wynikająca z modulacji aktywności wybranych czynników transkrypcyjnych.

Rozwój terapii opartych na receptorach chimerycznych przebiegał etapami, które przyjęło się określać kolejnymi generacjami CAR [29]. Konstrukty pierwszej generacji zawierały wyłącznie pojedynczą domenę sygnałową CD3 ζ , odpowiedzialną za podstawową aktywację limfocyta, jednak ich skuteczność kliniczna była ograniczona ze względu na słabą proliferację i krótką trwałość odpowiedzi komórek efektorowych [16]. Wprowadzenie drugiej generacji, w której domenę CD3 ζ uzupełniono o jedną domenę kostymulującą (najczęściej CD28 lub 4-1BB), istotnie poprawiło przeżywalność i trwałość aktywacji limfocytów, co przełożyło się na kliniczny sukces pierwszych zarejestrowanych terapii CAR-T [5, 29]. Trzecia generacja rozszerza ten schemat o dwie domeny

kostymulujące jednocześnie, natomiast czwarta generacja (określana też jako TRUCK lub armored CAR) wprowadza dodatkowe elementy funkcjonalne, takie jak indukowane wydzielanie cytokin, mające na celu modulację mikrośrodowiska guza [37, 41].

Potencjał terapeutyczny receptorów chimerycznych potwierdziły wyniki badań klinicznych oraz rejestracja kilku terapii CAR-T w leczeniu nowotworów hematologicznych, w tym ostrej białaczki limfoblastycznej oraz chłoniaków nieziarniczych, u pacjentów opornych na standardowe leczenie [6]. Uzyskiwane odsetki remisji, niemożliwe do osiągnięcia dotychczasowymi metodami, uczyniły z tego podejścia jeden z najbardziej obiecujących kierunków onkologii precyzyjnej [29]. Równolegle trwają intensywne prace nad rozszerzeniem zastosowań terapii opartych na receptorach chimerycznych poza nowotwory hematologiczne, w tym na guzy lite, choroby autoimmunologiczne oraz wirusowe, a także nad ograniczeniem działań niepożądanych, takich jak zespół uwalniania cytokin czy neurotoksyczność [12, 38, 41].

Kluczowym elementem determinującym skuteczność i bezpieczeństwo konstruktu CAR pozostaje dobór kombinacji domen wewnątrzkomórkowych [7, 10]. Wybór, liczba i wzajemne ułożenie domen sygnałowych oraz kostymulujących wpływają nie tylko na siłę i trwałość aktywacji limfocyty, lecz również na jego podatność na wyczerpanie funkcjonalne (*ang. exhaustion*), profil wydzielanych cytokin oraz ryzyko toksyczności ogólnoustrojowej [7, 10]. Dotychczasowe podejścia do projektowania tych domen mają w dużej mierze charakter empiryczny i kombinatoryczny. W ramach projektowania należy wybrać kilka domen spośród zbioru domen znanych z aktywacji fizjologicznej limfocyty T (lub jej ściśle określonych kombinacji). W praktyce poszukuje się takiego podzbioru, który zapewni skuteczną aktywację komórki, przy czym nie zakłada się konieczności wykorzystania wszystkich dostępnych elementów, dopuszczając jednocześnie możliwość naturalnej kostymulacji pochodzącej spoza analizowanego zbioru [7, 10].

Tak sformułowany problem wykazuje istotne podobieństwo strukturalne do zagadnienia znajdowania minimalnych zbiorów prekursorów (*ang. minimal precursor sets, MPS*) w sieciach metabolicznych i sygnałowych, gdzie celem jest identyfikacja najmniejszego podzbioru elementów wejściowych wystarczającego do wywołania określonego efektu w sieci [2]. Istniejące propozycje algorytmów znajdowania MPS i ich implementacje, choć są skuteczne w analizie sieci metabolicznych, napotykają istotne ograniczenia przy próbie zastosowania ich do sieci sygnałowych o charakterze regulacyjnym [2, 3, 8, 15, 24, 31, 1]. Wynika to przede wszystkim z przyjmowanych w tych metodach założeń upraszczających strukturę cykli w grafie, polegających najczęściej na usuwaniu wybranych krawędzi cyklicznych, co obniża wiarygodność biologiczną uzyskanych wyników, a także z niedostatecznego rozróżnienia relacji aktywujących i hamujących, kluczowego dla poprawnej interpretacji sieci sygnałowych.

W niniejszej pracy prezentujemy sieć Petriego modelującą proces aktywacji limfocyty T, dla której przeprowadzono analizy oraz symulacje wskazujące potencjalnych kandydatów na domeny wewnątrzkomórkowe receptora CAR-T, co wykonano za pomocą narzędzia Holmes [30]. Niezależnie zastosowano istniejące narzędzie precursor [1] oparte na gringo i bioasp [19, 20] do wyznaczania zbiorów MPS w oparciu o markery aktywacji limfocyty zdefiniowane w tej samej sieci. Konfrontacja obu podejść pozwalała na zaproponowanie konkretnych kandydatów na domeny sygnałowe, jednocześnie umożliwiając krytyczną ocenę ograniczeń metod znajdowania MPS.

2. Definicja problemu

2.1. Sformułowanie sieci Petriego

Rozważaną sieć modelującą proces aktywacji limfocytu T reprezentujemy jako sieć Petriego

$$N = (P, T, F, W, M_0), \quad (1)$$

gdzie P oznacza zbiór miejsc (odpowiadających cząsteczkom sygnałowym, białkom adaptorowym oraz czynnikom transkrypcyjnym), T zbiór tranzycji (reprezentujących reakcje i kroki przekazywania sygnału), $F \subseteq (P \times T) \cup (T \times P)$ jest zbiorem łuków, W jest funkcję wagową łuków, a M_0 oznacza oznakowanie początkowe odpowiadające spoczynkowemu (nieaktywowanemu) stanowi komórki [27]. Dopuszczalne jest, aby sieć Petriego posiadała cykle, wagi lub łuki hamujące, dzięki czemu sieci Petriego są w stanie rzetelnie uchwycić dynamikę procesów biologicznych.

W obrębie P wyróżniamy dwa istotne dla naszego problemu podzbiory:

- $D \subset P$ – zbiór kandydatów na domeny wewnątrzkomórkowe receptora CAR-T, tj. elementów sieci, o których wiadomo na podstawie warunków fizjologicznych, że (pojedynczo lub w określonych kombinacjach) ulegają aktywacji w naturalnym procesie sygnalizacji TCR/kostymulacji;
- $Z \subset P$ – zbiór markerów aktywacji limfocytu, rozumianych na przykład jako docelowe czynniki transkrypcyjne (np. NFAT, NF- κ B, AP-1), których jednoczesna aktywacja świadczy o skutecznym uruchomieniu programu efektorowego komórki.

2.2. Problem wyboru domen wewnątrzkomórkowych

Poszukujemy takiego podzbioru domen D , który umieszczony w konstrukcie receptora chimerycznego, doprowadzi sieć do stanu, w którym wszystkie (lub biologicznie wystarczające) elementy Z zostają aktywowane, przy zachowaniu realistycznej dynamiki sieci (a więc z uwzględnieniem hamowania, wag i cykli).

Definicja 1 (Wybór domen wewnątrzkomórkowych). Niech $N = (P, T, F, W, M_0)$ będzie siecią Petriego, $D \subset P$ zbiorem proponowanych do analizy domen, a $Z \subset P$ zbiorem docelowych markerów aktywacji. Dla podzbioru $S \subseteq D$ niech M_0^S oznacza znakowanie początkowe M_0 rozszerzone o aktywację (umieszczenie tokenów w) miejsc należących do S . Mówimy, że S jest zbiorem *satysfakcjonującym*, jeśli istnieje sekwencja odpalania tranzycji prowadząca od M_0^S do oznakowania M' , w którym wszystkie miejsca należące do Z są aktywne, tj.

$$M'(z) > 0 \quad \text{dla każdego } z \in Z.$$

Celem jest znalezienie zbiorów satysfakcjonujących $S \subseteq D$, przy czym zgodnie z biologicznym charakterem problemu dopuszczamy, że $|S| < |D|$ (np. 3 z 6 dostępnych domen), a pozostałe elementy sieci spoza D pozostają w swoim naturalnym, niezależnym reżimie aktywności określonym przez M_0 , odpowiadając możliwej kostymulacji pochodzącej spoza analizowanego zbioru domen. Innymi słowy, nie zakładamy, że S musi samodzielnie i wyłącznie „wyprodukować” aktywację Z w oderwaniu od reszty sieci – wystarczy, że w kontekście całej sieci prowadzi do niej w sposób odtworzalny.

2.3. Definicja MPS i różnice względem problemu wyboru domen wewnątrzkomórkowych

Definicja 2 (Minimalny zbiór prekursorów (MPS), za Acuña i in. [2], w oparciu o Romero i Karp [31] oraz Cottret i in. [8]). Niech sieć metaboliczna będzie modelowana jako skierowany hipergraf $G = (C, R)$ nad zbiorem metabolitów C oraz zbiorem reakcji R , z wyróżnionym zbiorem źródeł $S \subset C$ i zbiorem docelowym $T \subset C$. Podzbiór $X \subseteq S$ nazywamy *zbiorem prekursorów* dla T , jeśli T jest produkowalne z X w sensie propagacji w przód sieci reakcji, dopuszczając przy tym wewnętrzne zaopatrzenie Z dla metabolitów odtwarzanych w cyklach (por. [8]). Zbiór prekursorów X nazywamy *minimalnym* (MPS), jeśli żaden jego właściwy podzbiór nie jest już zbiorem prekursorów dla T . Problem MPS polega na enumeracji wszystkich takich inkluzyjnie minimalnych zbiorów w obrębie S .

Pomiędzy problemem wyboru domen wewnątrzkomórkowych a klasyczną definicją MPS istnieją cztery istotne różnice, wynikające bezpośrednio ze specyfiki biologicznej badanych procesów:

1. **Przestrzeń przeszukiwania.** Algorytmy MPS przeszukują cały zbiór związków źródłowych sieci S , który w sieciach metabolicznych bywa bardzo liczny i obejmuje wszystkie zewnętrzne wejścia systemu. W problemie wyboru domen przestrzeń poszukiwań jest z góry ograniczona do wyróżnionego, biologicznie zdefiniowanego podzbioru $D \subset P$ – nie interesuje nas, czy jakikolwiek inny element całej sieci mógłby pełnić rolę prekursora, lecz wyłącznie kombinacje w obrębie zadanego zbioru proponowanych do analizy domen.
2. **Status minimalności.** W Definicji MPS inkluzyjna minimalność jest głównym kryterium poprawności rozwiązania i to właśnie ona definiuje, czym jest MPS. W konsekwencji cały problem obliczeniowy sprowadza się do enumeracji zbiorów spełniających ten warunek. W problemie wyboru domen wewnątrzkomórkowych minimalność jest kryterium pożądanym, ale wynika ze specyfiki biologicznej i budowy samego receptora: zależy nam przede wszystkim na tym, by wskazany podzbiór domen rzeczywiście i w sposób wiarygodny prowadził do aktywacji Z , nawet jeśli nie dysponujemy formalnym dowodem, że jest to podzbiór najmniejszy z możliwych. Innymi słowy, szukamy zbiorów satysfakcjonujących, a minimalizacja ich liczności traktowana jest jako kryterium dodatkowe (np. przy wyborze spośród kilku kandydatów), a nie jako warunek istnienia rozwiązania.
3. **Charakter dodatkowego wsparcia poza wybranym podzbiorem.** Definicja MPS w wariacie Cottret i in. [8] dopuszcza dodatkowe źródło metabolitów poza analizowanym podzbiorem X w postaci wewnętrznego zaopatrzenia, jednak nie jest to wsparcie „darmowe” i wymaga, aby samo zostało odtworzone w toku propagacji zainicjowanej przez X . Mechanizm ten służy wyłącznie do rozwiązania problemu jednoczesności w cyklach (metabolit musi być dostępny, by cykl mógł ruszyć, choć sam jest jego produktem), a nie do modelowania niezależnego od X wsparcia z zewnątrz systemu. W problemie wyboru domen wewnątrzkomórkowych sytuacja jest odmienna: znakowanie początkowe M_0 pozostaje aktywne niezależnie od wyboru S i nie musi być w żaden sposób „odtworzone” czy uzasadnione przez S . Odzwierciedla to fakt, że inne szlaki kostymulujące (spoza D) fizjologicznie współwystępują i wspierają aktywację w spo-

sób całkowicie niezależny od projektowanego receptora, a nie stanowią technicznego zabiegu rachunkowego potrzebnego do zamknięcia cyklu.

4. **Mechanizm obsługi cykli.** Definicja MPS w podejściu iteracyjnym (Romero i Karp [31]) w ogóle nie można go stosować dla hipergrafów z cyklami, natomiast rozszerzenia z prac Cottreta i in. [8] oraz Acuña i in. [2] wymaga wprowadzenia dodatkowego, technicznego konstruktu (wewnętrznego zaopatrzenia), aby dopuścić jednocześnie dostępność i produkcję metabolitów w cyklu. W problemie wyboru domen sygnałowych taki zabieg nie jest konieczny: sekwencja przejść w sieci Petriego (zgodnie z regułą $M \xrightarrow{t} M'$) w naturalny sposób obsługuje współbieżną konsumpcję i produkcję tokenów w obrębie cykli, bez potrzeby wprowadzania dodatkowych, sztucznych zbiorów wspierających. To właśnie ta rozbieżność w warstwie formalizmu, stanowi jedno ze źródeł trudności przy próbie bezpośredniego zastosowania istniejących implementacji algorytmów MPS (opierających się na uproszczeniach typu usuwanie krawędzi, w celu eliminacji cykli) do sieci takich jak ta prezentowana w niniejszej pracy.

3. Model oparty na sieci Petriego

Na potrzeby badań utworzono model aktywacji limfocytu T będący siecią Petriego z wykorzystaniem oprogramowania Holmes [30]. W jego skład wchodzi 125 miejsc i 145 tranzycji. Ich znaczenie biologiczne zostało przedstawione w tabelach. Tabela 1 zawiera listę miejsc, a tabela 2 zawiera listę tranzycji. Graficzna reprezentacja modelu została przedstawiona na rysunku 2. Jest ona podzielona na regiony A-G w celu ułatwienia opisu rzeczywistości biologicznej, którą przedstawia. W przedstawionym poniżej opisie modelu w nawiasach podano numery miejsc i tranzycji odnoszących się do omawianych obiektów i procesów.

A. Transdukcja sygnału bezpośrednio poniżej receptora TCR

Receptor TCR (ang. *T cell antigen receptor*) (p_{92}) składa się z domen α (p_0) i β (p_1), dwóch domen CD3 ζ (p_4) oraz okalających go dwóch heterodimerów: CD3 γ CD3 ϵ (p_{89}) i CD3 δ CD3 ϵ (p_{88}) [33]. Podjednostki α i β wiążą MHC na komórce prezentującej antygen, co prawdopodobnie prowadzi do zmian w konformacji podjednostek CD3 (t_{104}). Dzięki temu motywy ITAM na CD3 mogą być ufosforylowane przez Lck (t_{106}) [33]. Do tak zmodyfikowanych CD3 wiąże się ZAP70 (p_{102}) i zyskuje zdolność do fosforylowania SLP76 (p_6) oraz LAT (p_8) [32]. SLP76 oraz LAT są białkami adaptorowymi i pełnią funkcję budulcową przy tworzeniu się kompleksu proksymalnego TCR. Kompleks ten składa się z LAT (p_6), SLP76 (p_8), GADS (p_{11}), GRB2 (p_{81}), Vav (p_{106}), Itk (p_{104}) oraz PLC γ 1 (p_{109}) [33]. GRB2 natywnie występuje w kompleksie z GADS, który stanowi most między SLP76 i LAT [26]. Itk jest kinazą, która jest aktywowana przez Lck (t_{117}), która to aktywacja byłaby znacząco utrudniona, gdyby Itk nie występowało w kompleksie proksymalnym TCR. Ufosforylowane Itk fosforyluje PLC γ 1 (t_{120}), które po tej aktywacji hydrolizuje PIP2 (t_{13}), w efekcie czego powstaje IP3 (p_{15}) i DAG (p_{18}) [33].

B. Regulacja aktywności kinazy Lck

Regulacja transdukcji sygnału poniżej TCR odbywa się często poprzez regulację aktywności Lck. Csk (p_{94}) fosforyluje Lck na pozycji Y505 (t_{94}) sprawiając, że Lck pozostaje nieaktywne [23]. CD45 (p_{96}) jest zdolne przywrócić Lck przez defosforylację na pozycji

Y505 (t_{98}) umożliwiając autofosforylację Lck (t_{58}). Jest to jego aktywność kostymulująca. Jednak CD45 działa również jako negatywny regulator Lck poprzez jego defosforylację w miejscu aktywnym (t_{102}) [23]. SHP1 (p_{97}) jest negatywnym regulatorem Lck. Wymaga on aktywacji poprzez fosforylację przez Lck (t_{100}), następnie dezaktywuje Lck poprzez jego defosforylację (t_{102}) [35]. Lck, aby zadziałać na rzecz fosforylacji motywów ITAM na CD3 (t_{106}), musi być zarekrutowany do błony komórkowej poprzez interakcję z CD4 (p_{111}) [32].

C. Szlak PI3K

CD28 (p_{71}) działa po związaniu liganda na komórce prezentującej antygen. Może to być zarówno CD80 (p_{72}), jak i CD86 (p_{73}). Do CD28 związanego z ligandem może przyłączyć się p85 (t_{72}) — domena regulatorowa PI3K. Następnie do p85 przyłącza się p110 (t_{73}) — domena PI3K o działaniu katalitycznym. Tak powstała aktywna forma PI3K (p_{78}) działa na rzecz przemiany PIP2 w PIP3 (t_{74}) [33]. Do PIP3 (p_{80}) wiąże się PDK1 (p_{84}), które następnie fosforyluje Akt (p_{79}) [33]. Ufosforylowane Akt między innymi fosforyluje GSK3 dając mu jego aktywność katalityczną (t_{143}). GSK3 jest negatywnym regulatorem NFAT — fosforyluje go promując jego pozostanie w cytoplazmie (p_{71}) [4, 33]. CTLA4 (p_{93}) wiąże się z takimi samymi ligandami jak CD28 (CD80 (t_{93}) i CD86 (t_{103})) i jest negatywnym regulatorem aktywacji limfocytów [39]. ICOS (p_{82}) działa analogicznym szlakiem jak CD28 [33].

D. Szlak wapniowy

Powstałe pod wpływem PLC γ 1 IP3 (p_{15}) wiąże się z IP3R na błonie retikulum endoplazmatycznego (t_4), prowadząc do jego aktywacji i wydostania się Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego do cytoplazmy (t_5). STIM (p_{23}) wykrywa niedobory Ca^{2+} w ER, kongreguje się z ORAI (p_{21}) na powierzchni błony komórkowej, co prowadzi do importu jonów wapnia z zewnątrz komórki do wnętrza (t_{71}). Także Ca^{2+} dostaje się do cytoplazmy zarówno z ER, jak i z zewnątrz komórki [33, 28].

Nagromadzenie się Ca^{2+} w cytoplazmie prowadzi do aktywacji kalcyneuryny (t_8), która defosforyluje NFAT (t_9). Defosforylowany NFAT prowadzi do ekspresji genów [33]. Wspólnie z AP1 (p_{30}) prowadzi do ekspresji interleukiny IL2 (t_{14}) [32], która wspiera proces proliferacji i przeżycia komórki (t_{19}) [25]. Natomiast niezależnie od AP1 prowadzi do ekspresji DGK α (p_{29}), czynnika odpowiedzialnego za anergię (t_{12}) [32].

E. Szlak PKC θ

PKC θ (p_{33}) wiąże się z DAG, co powoduje jego rekrutację do tratw lipidowych na błonie komórkowej i jego aktywację (t_{22}) [32]. Następnie aktywna forma PKC θ fosforyluje CARMA1 (t_{23}), prowadząc do jego oligomeryzacji (t_{24}). Później CARMA1 wiąże się z BIC10 (t_{25}), a do niego wiąże się MALT1 (t_{26}) [40]. Tak powstały kompleks, nazywany skrótowo CBM (p_{41}), aktywuje TRAF6 (t_{32}). TRAF6 poliubikwitynuje IKK γ (t_{34}), domenę regulatorową kompleksu IKK (p_{37}), prowadząc do jej degradacji [32, 33, 36]. Pozostałe elementy kompleksu IKK — IKK α i IKK β — fosforylują I κ B prowadząc do rozpadu kompleksu NF κ B I κ B (p_{51}) i degradacji I κ B (t_{42}). Uwolnione NF κ B przechodzi do jądra komórkowego (t_{43}) i działa jako czynnik regulatorowy na rzecz transkrypcji genów (t_{44}) [32].

F. Szlak MAPK

DAG oprócz wiązania PKC θ może też wiązać RASGRP1 rekrutując je do błony komórkowej i prowadząc do jego aktywacji (t_{46}) [14, 33]. RASGRP1 pośredniczy w wiązaniu

RAS z GTP (t_{49}). RASGTP aktywuje Raf (t_{50}), które fosforyluje MEK1/2 (t_{53}), które z kolei fosforyluje ERK1/2 (t_{55}) [17]. ERK1/2 jest kinazą i prowadzi do fosforylacji STAT3 (t_{60}) [21]. ERK1/2 również fosforyluje Lck (t_{60}) zabezpieczając je przed fosforylacją przez SHP1 [35]. Innym celem ERK1/2 jest Elk, które ufosforylowane (p_{68}) działa jako regulator na rzecz transkrypcji genów związanych z aktywacją limfocytu (t_{63}) [21].

G. Szlak OX40

OX40, inaczej nazywane CD134 (p_{115}), wiąże się z OX40L (p_{116}) występującym między innymi na komórce prezentującej antygen [33]. Kompleks proksymalny OX40 składa się z kompleksu TRAF2 TRAF3 TRAF5 (p_{114}), kompleksu IKK (p_{47}) oraz Akt (p_{85}) i p_{85} (p_{75}). Utworzenie się tego kompleksu i jego połączenie z OX40, po ligacji OX40 z OX40L, prowadzi do fosforylacji IKK α /IKK β (t_{141}). Prowadzi to do fosforylacji I κ B i w konsekwencji do przejścia NF κ B do jądra komórkowego [9, 34].

Tabela 1

Lista miejsc

Miejsce	Znaczenie biologiczne	Miejsce	Znaczenie biologiczne
p_0	TCR α	p_{63}	ufosforylowane ERK1/2
p_1	TCR β	p_{64}	STAT3
p_2	CD3 ϵ	p_{65}	Lck
p_3	CD3 δ	p_{66}	aktywne Lck
p_4	CD3 ζ	p_{67}	Elk
p_5	CD3 γ	p_{68}	ufosforylowane Elk
p_6	SLP-76	p_{69}	Jun
p_7	aktywne ZAP-70	p_{70}	Fos
p_8	LAT	p_{71}	CD28
p_9	ufosforylowane SLP-76	p_{72}	CD80
p_{10}	pufosforylowane LAT	p_{73}	CD86
p_{11}	Gads	p_{74}	activated CD28
p_{12}	kompleks Gads GRB2	p_{75}	p_{85}
p_{13}	PLC γ 1 aktywowany w kompleksie proksymalnym szlaku TCR	p_{76}	p_{110}
p_{14}	PIP2	p_{77}	p_{85} związany z CD28
p_{15}	IP3	p_{78}	aktywne PI3K
p_{16}	IP3R	p_{79}	PIP2
p_{17}	IP3R aktywowany przez IP3	p_{80}	PIP3
p_{18}	DAG	p_{81}	GRB2
p_{19}	Ca $^{2+}$ w retikulum endoplazmatycznym	p_{82}	ICOS
p_{20}	Ca $^{2+}$ w cytoplazmie	p_{83}	p_{85} związane z ICOS
p_{21}	ORAI	p_{84}	PKD1
p_{22}	Ca $^{2+}$ na zewnątrz komórki	p_{85}	Akt
p_{23}	STIM	p_{86}	PKD związane z PIP3
p_{24}	kalcineuryna	p_{87}	phosphorylated Akt
p_{25}	aktywowana kalcineuryna	p_{88}	dimer CD3 δ CD3 ϵ
p_{26}	defosforylowany NFAT	p_{89}	dimer CD3 γ CD3 ϵ
p_{27}	NFAT w jądrze komórkowym	p_{90}	homodimer CD3 ζ
p_{28}	NFAT	p_{91}	dimer TCR α TCR β
p_{29}	DGKalpha	p_{92}	kompleks TCR
p_{30}	AP1	p_{93}	CTLA4
p_{31}	NFAT w kompleksie z AP1	p_{94}	Csk
p_{32}	IL2	p_{95}	Lck ufosforylowane w pozycji Y505
p_{33}	PKC θ	p_{96}	CD45
p_{34}	aktywowane PKC θ	p_{97}	SHP1
p_{35}	CARMA1	p_{98}	aktywne SHP1
p_{36}	ufosforylowane CARMA1	p_{99}	MHC
p_{37}	oligomer CARMA1	p_{100}	TCR ze swoim ligandem
p_{38}	Bcl10	p_{101}	kompleks TCR z ufosforylowanymi motywami ITAM
p_{39}	kompleks CARMA1 z Bcl10	p_{102}	ZAP-70
p_{40}	MALT1	p_{103}	kompleks Gads GRB2 LAT SLP76
p_{41}	kompleks CBM	p_{104}	Itk
p_{42}	TRAF6	p_{105}	kompleks SLP-76 LAT Gads GRB2 Vav

Miejsce	Znaczenie biologiczne	Miejsce	Znaczenie biologiczne
<i>p</i> ₄₃	aktywowane TRAF6	<i>p</i> ₁₀₆	Vav
<i>p</i> ₄₄	IKK α	<i>p</i> ₁₀₇	kompleks Itk SLP-76 LAT Gads GRB2 Vav
<i>p</i> ₄₅	IKK β	<i>p</i> ₁₀₈	kompleks Itk SLP-76 LAT Gads GRB2 Vav PKC γ 1
<i>p</i> ₄₆	IKK γ	<i>p</i> ₁₀₉	PLC γ 1
<i>p</i> ₄₇	kompleks IKK	<i>p</i> ₁₁₀	kompleks proksymalny szlaku TCR z aktywowanym Itk
<i>p</i> ₄₈	kompleks IKK α IKK β	<i>p</i> ₁₁₁	CD4
<i>p</i> ₄₉	I κ B	<i>p</i> ₁₁₂	aktywne Lck zlokalizowane na błonie komórkowej
<i>p</i> ₅₀	NF κ B	<i>p</i> ₁₁₃	aktywne Lck ufosforylowane w pozycji Ser59
<i>p</i> ₅₁	kompleks NF κ B I κ B	<i>p</i> ₁₁₄	TRAF2,3and5 complex
<i>p</i> ₅₂	NF κ B w jądrze komórkowym	<i>p</i> ₁₁₅	OX40
<i>p</i> ₅₃	RASGRP1	<i>p</i> ₁₁₆	OX40L
<i>p</i> ₅₄	aktywowane RASGRP1	<i>p</i> ₁₁₇	aktywowane OX40
<i>p</i> ₅₅	RAS	<i>p</i> ₁₁₈	proksymalny kompleks szlaku OX40
<i>p</i> ₅₆	GTP	<i>p</i> ₁₁₉	TRAF3
<i>p</i> ₅₇	RAS GTP	<i>p</i> ₁₂₀	TRAF5
<i>p</i> ₅₈	Raf1	<i>p</i> ₁₂₁	TRAF2
<i>p</i> ₅₉	aktywowane Raf1	<i>p</i> ₁₂₂	aktywowany proksymalny kompleks szlaku OX40
<i>p</i> ₆₀	MEK1/2	<i>p</i> ₁₂₃	ufosforylowany kompleks IKK α IKK β
<i>p</i> ₆₁	ufosforylowane MEK1/2	<i>p</i> ₁₂₄	GSK3
<i>p</i> ₆₂	ERK1/2		

Tabela 2

Lista tranzycji

Tranzycja	Znaczenie biologiczne	Tranzycja	Znaczenie biologiczne
<i>t</i> ₀	fosforylacja LAT	<i>t</i> ₇₃	asocjacja p110 z p85
<i>t</i> ₁	LAT phosphorylation	<i>t</i> ₇₄	konwersja PIP2 w PIP3
<i>t</i> ₂	wiązanie pomiędzy Gads i GRB2	<i>t</i> ₇₅	ekspresja GRB2
<i>t</i> ₃	hydroliza PIP2	<i>t</i> ₇₆	asocjacja p85 z ICOS
<i>t</i> ₄	wiązanie IP3 do IP3R	<i>t</i> ₇₇	aktywacja ICOS
<i>t</i> ₅	wypuszczenie zasobów Ca ²⁺ z retikulum endoplazmatycznego do cytoplazmy	<i>t</i> ₇₈	dokowanie PDK1 do PIP3
<i>t</i> ₆	agregacja STIM	<i>t</i> ₇₉	fosforylacja Akt przez PDK1
<i>t</i> ₇	napływ Ca ²⁺ z poza komórki	<i>t</i> ₈₀	fosforylacja NFAT
<i>t</i> ₈	aktywacja kalcyneuryny	<i>t</i> ₈₁	ekspresja TCR α
<i>t</i> ₉	defosforylacja NFAT	<i>t</i> ₈₂	ekspresja TCR β
<i>t</i> ₁₀	przejście NFAT do jądra komórkowego	<i>t</i> ₈₃	dimeryzacja TCR
<i>t</i> ₁₁	ekspresja DGK α	<i>t</i> ₈₄	ekspresja CD3 δ
<i>t</i> ₁₂	anergia	<i>t</i> ₈₅	ekspresja CD3 ϵ
<i>t</i> ₁₃	wiązanie NFAT z AP1	<i>t</i> ₈₆	ekspresja CD3 γ
<i>t</i> ₁₄	ekspresja IL2	<i>t</i> ₈₇	ekspresja CD3 ζ
<i>t</i> ₁₅	pojawienie się Ca ²⁺ w ER	<i>t</i> ₈₈	wiązanie pomiędzy CD3 δ i CD3 ϵ
<i>t</i> ₁₆	ekspresja kalcyneuryny	<i>t</i> ₈₉	wiązanie pomiędzy CD3 γ i CD3 ϵ
<i>t</i> ₁₇	pojawienie się Ca ²⁺ w otoczeniu limfocyty T	<i>t</i> ₉₀	dimeryzacja CD3 ζ
<i>t</i> ₁₈	ekspresja NFAT	<i>t</i> ₉₁	utworzenie kompleksu TCR
<i>t</i> ₁₉	prolifracja i przeżycie limfocyty T	<i>t</i> ₉₂	ekspresja CTLA4 na błonie komórkowej
<i>t</i> ₂₀	ekspresja PIP2	<i>t</i> ₉₃	wiązanie CTLA4 z CD80
<i>t</i> ₂₁	ekspresja IP3R	<i>t</i> ₉₄	fosforylacja Lck w pozycji Y505
<i>t</i> ₂₂	wiązanie PKC θ z DAG;rekrutacja PKC θ do trawy lipidowej i jego aktywacja	<i>t</i> ₉₅	utrzymanie Lck w formie nieaktywnej
<i>t</i> ₂₃	fosforylacja CARMA1	<i>t</i> ₉₆	ekspresja Csk
<i>t</i> ₂₄	oligomeryzacja CARMA1	<i>t</i> ₉₇	aktywacja CD45
<i>t</i> ₂₅	wiązanie Bcl10 z CARMA1	<i>t</i> ₉₈	defosforylacja Lck w pozycji Y505
<i>t</i> ₂₆	wiązanie MALT1 z Bcl10	<i>t</i> ₉₉	defosforylacja Lck
<i>t</i> ₂₇	ekspresja PKC θ	<i>t</i> ₁₀₀	fosforylacja SHP1
<i>t</i> ₂₈	ekspresja CARMA1	<i>t</i> ₁₀₁	ekspresja SHP1
<i>t</i> ₂₉	ekspresja Bcl10	<i>t</i> ₁₀₂	defosforylacja Lck przez SHP1
<i>t</i> ₃₀	ekspresja MALT1	<i>t</i> ₁₀₃	wiązanie CTLA4 z CD86
<i>t</i> ₃₁	ekspresja TRAF6	<i>t</i> ₁₀₄	ligacja TCR i zmiany w konformacji kompleksu TCR
<i>t</i> ₃₂	aktywacja TRAF6	<i>t</i> ₁₀₅	pojawienie się MHC na komórce prezentującej antygen w pobliżu TCR znajdującego się na limfocycie T
<i>t</i> ₃₃	utworzenie kompleksu IKK	<i>t</i> ₁₀₆	fosforylacja motywów ITAM na CD3
<i>t</i> ₃₄	poliubikwitinacja i degradacja IKK γ	<i>t</i> ₁₀₇	ekspresja ZAP70
<i>t</i> ₃₅	ekspresja IKK α	<i>t</i> ₁₀₈	rekrutacja ZAP-70 do kompleksu TCR
<i>t</i> ₃₆	ekspresja IKK β	<i>t</i> ₁₀₉	ekspresja Gads

Tranzycja	Znaczenie biologiczne	Tranzycja	Znaczenie biologiczne
t_{37}	ekspresja IKK γ	t_{110}	ekspresja SLP76
t_{38}	rozpad kompleksu IKK	t_{111}	ekspresja LAT
t_{39}	ekspresja I κ B	t_{112}	Gads wiąże LAT z SLP-76
t_{40}	ekspresja NF κ B	t_{113}	wiązanie Vav z kompleksem Gads GRB2 LAT SLP76
t_{41}	utworzenie kompleksu NF κ B I κ B	t_{114}	ekspresja Itk
t_{42}	fosforylacja I κ B i jego degradacja	t_{115}	wiązanie Itk z kompleksem SLP-76 LAT Gads GRB2 Vav
t_{43}	przejście NF κ B do jądra komórkowego	t_{116}	ekspresja Vav
t_{44}	aktywność regulatorowa NF κ B	t_{117}	aktywacja Itk przez Lck
t_{45}	ekspresja RASGRP1	t_{118}	wiązanie PLC γ 1 do kompleksu proksymalnego szlaku TCR
t_{46}	rekrutacja RASGRP1 do błony komórkowej i jego aktywacja	t_{119}	ekspresja PLC γ 1
t_{47}	ekspresja RAS	t_{120}	fosforylacja of PLC γ 1 przez Itk
t_{48}	metabolizm komórkowy	t_{121}	ekspresja PIP2
t_{49}	aktywacja RAS	t_{122}	ekspresja PDK1
t_{50}	aktywacja Raf1	t_{123}	ekspresja Akt
t_{51}	ekspresja Raf1	t_{124}	ekspresja p85
t_{52}	ekspresja MEK1/2	t_{125}	ekspresja p110
t_{53}	fosforylacja MEK1/2	t_{126}	wiązanie CD28 z GRB2
t_{54}	ekspresja ERK1/2	t_{127}	wiązanie p110 z kompleksem p85 ICOS
t_{55}	fosforylacja ERK1/2	t_{128}	interakcja Lck z CD4
t_{56}	ekspresja STAT3	t_{129}	aktywacja CD4
t_{57}	ekspresja Lck	t_{130}	interakcja Lck zmodyfikowanego przez ERK1/2 z CD4
t_{58}	autofosforylacja i aktywacja Lck	t_{131}	utworzenie kompleksu proksymalnego szlaku OX40
t_{59}	fosforylacja STAT3 przez ERK1/2	t_{132}	utworzenie kompleksu TRAF2 TRAF3 TRAF5
t_{60}	fosforylacja Lck na pozycji Ser59 przez ERK1/2	t_{133}	pojawienie się OX40L w otoczeniu limfocyty T na komórce prezentującej antygen
t_{61}	ekspresja Elk	t_{134}	ekspresja OX40
t_{62}	fosforylacja Elk przez ERK1/2	t_{135}	ligacja OX40 z OX40L
t_{63}	transkrypcja c-Fos i innych genów pod wpływem Elk	t_{136}	rozpad kompleksu TRAF2 TRAF3 TRAF5
t_{64}	utworzenie kompleksu AP1	t_{137}	ekspresja TRAF2
t_{65}	ekspresja Jun	t_{138}	ekspresja TRAF3
t_{66}	ekspresja Fos	t_{139}	ekspresja TRAF5
t_{67}	ligacja CD28 z CD86	t_{140}	wiązanie OX40 z kompleksem proksymalnym szlaku OX40
t_{68}	ligacja CD28 z CD80	t_{141}	fosforylacja IKK α/β
t_{69}	pojawienie się CD28 na błonie komórkowej	t_{142}	fosforylacja I κ B w szlaku OX40 i jego degradacja
t_{70}	pojawienie się CD80 w otoczeniu limfocyty T	t_{143}	fosforylacja GSK3
t_{71}	pojawienie się CD86 w otoczeniu limfocyty T	t_{144}	ekspresja GSK3
t_{72}	asocjacja p85 z motywem pYMN na CD28		

Procesom w sieciach Petriego odpowiadają t-niezmienniki. Rozważana sieć Petriego jest pokryta przez 51 t-niezmienników. Jako nietrywialne zbiory MCT definiuje się zbiory MCT zawierające co najmniej dwie tranzycje. Odpowiadają one funkcjonalnym blokom modelowanego systemu biologicznego [18]. Aby mieć lepszy wgląd w działanie zamodelowanego systemu przeanalizowano zbiory MCT. Dla badanego modelu uzyskano 18 nietrywialnych zbiorów MCT. Dla każdego z nich określono znaczenie biologiczne. Ich zestawienie przedstawione jest w tabeli 3.

Tabela 3

Lista nietrywialnych zbiorów MCT

Zbiór MCT	Tranzycje	Znaczenie biologiczne
m_1	$t_0, t_1, t_2, t_3, t_4, t_5, t_6, t_7, t_8, t_9, t_{15}, t_{16}, t_{17}, t_{20}, t_{21}, t_{81}, t_{82}, t_{83}, t_{84}, t_{85}, t_{86}, t_{87}, t_{88}, t_{89}, t_{90}, t_{91}, t_{104}, t_{105}, t_{106}, t_{107}, t_{108}, t_{109}, t_{110}, t_{111}, t_{112}, t_{113}, t_{114}, t_{115}, t_{116}, t_{117}, t_{118}, t_{119}, t_{120}, t_{129}$	szlak TCR przechodzący w szlak wapniowy prowadzący do defosforylacji NFAT
m_2	$t_{22}, t_{23}, t_{24}, t_{25}, t_{26}, t_{27}, t_{28}, t_{29}, t_{30}, t_{31}, t_{32}, t_{34}, t_{42}$	szlak PKC θ do degradacji I κ B

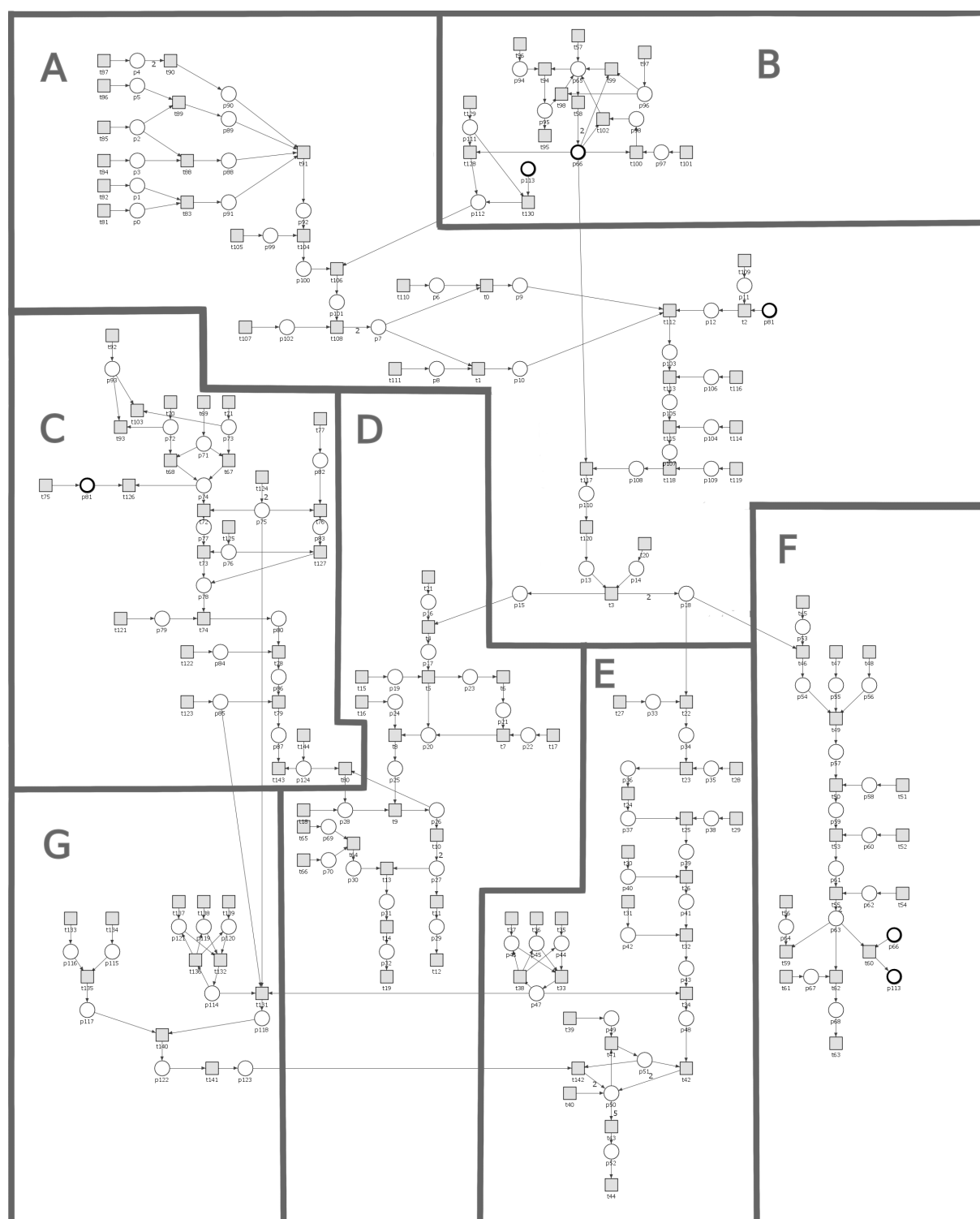
Zbiór MCT	Tranzycje	Znaczenie biologiczne
m_3	$t_{45}, t_{46}, t_{47}, t_{48}, t_{49}, t_{50}, t_{51}, t_{52}, t_{53}, t_{54}, t_{55}$	szlak MAPK do fosforylacji ERK1/2
m_4	$t_{131}, t_{133}, t_{134}, t_{135}, t_{137}, t_{138}, t_{139}, t_{140}, t_{141}, t_{142}$	szlak OX40
m_5	$t_{74}, t_{78}, t_{79}, t_{121}, t_{122}, t_{125}, t_{143}$	działanie PI3K, PDK1 i Akt na rzecz fosforylacji GSK3
m_6	$t_{13}, t_{14}, t_{19}, t_{64}, t_{65}, t_{66}$	Tworzenie się AP1 i jego działanie na rzecz aktywacji komórki poprzez ekspresję IL2
m_7	$t_{35}, t_{36}, t_{37}, t_{39}, t_{41}$	ekspresja części składowych kompleksu IKK i ekspresja I κ B oraz tworzenie się kompleksu NF κ B I κ B
m_8	t_{61}, t_{62}, t_{63}	obecność Elk w systemie i jego działanie na rzecz ekspresji genów
m_9	t_{76}, t_{77}, t_{127}	działanie ICOS jako cząsteczki kostymulującej
m_{10}	$t_{100}, t_{101}, t_{102}$	obecność SHP1 w systemie i jego działanie na rzecz hamowania aktywności Lck
m_{11}	t_{10}, t_{18}	ekspresja NFAT i jego przejście do jądra komórkowego
m_{12}	t_{11}, t_{12}	podproces odpowiadający za przejście limfocytu w stan anergii
m_{13}	t_{43}, t_{44}	Przejście NF κ B do jądra komórkowego i jego aktywność regulatorowa
m_{14}	t_{56}, t_{59}	część systemu związana z obecnością STAT3
m_{15}	t_{60}, t_{130}	reakcje związane bezpośrednio z obecnością Lck ufosforylowanego na pozycji Ser59
m_{16}	t_{72}, t_{73}	aktywność CD28 w procesie tworzenia kompleksu PI3K
m_{17}	t_{94}, t_{96}	działanie Csk w systemie
m_{18}	t_{123}, t_{124}	ekspresja p85 i Akt – czynników obecnych w szlaku PI3K i w szlaku OX40

4. Analiza sieci Petriego

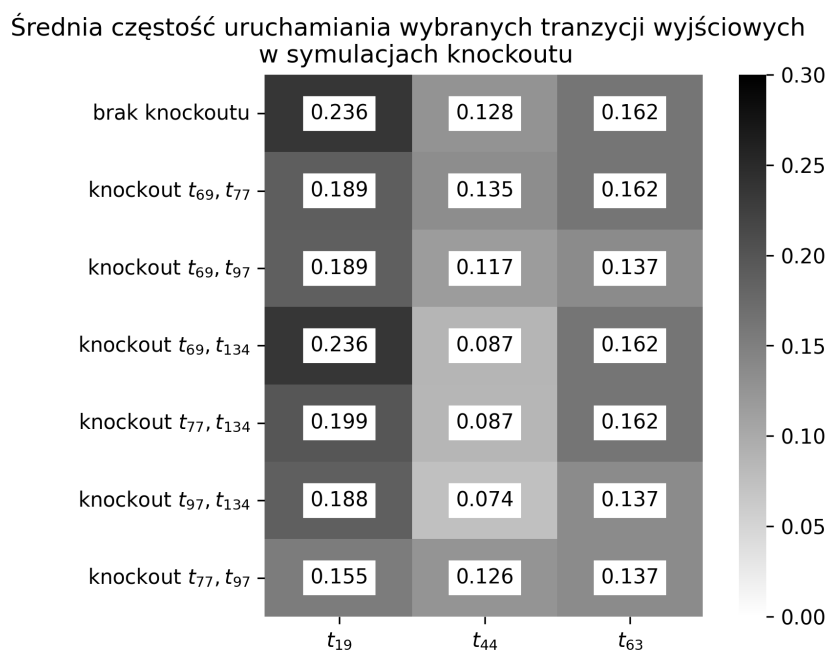
W zamodelowanym systemie (z pominięciem CD4) istnieją cztery receptory kostymulujące aktywację limfocytów: CD28, ICOS, CD45 i OX40. Zależało nam na wybraniu dwóch z nich jako donorów domen kostymulujących do konstruktu CAR-T. Wybranie dwóch potraktowano jako równoznaczne z odrzuceniem dwóch pozostałych. Owe odrzucenie przebadano za pomocą badań symulacyjnych knockoutów na modelu. Tak uruchomionych zostało sześć serii symulacji typu knockout (tyle wynosi liczba dwuelementowych kombinacji bez powtórzeń ze zbioru czteroelementowego) i siódma bez knockoutu jako referencja. Każda seria składała się z 500 symulacji po 100 000 kroków każda. Tym co było badane podczas tych symulacji była częstość uruchomień wybranych tranzycji wyjściowych (liczba kroków, w których te tranzycje się uruchomiły podzielona przez liczbę wszystkich kroków). Dla każdej serii 500 powtórzeń została wyznaczona średnia. Wybrane tranzycje wyjściowe to takie, które mówią o wpływie uruchomionych szlaków na aktywację limfocytu (t_{19} — proliferacja i przeżycie limfocytu T, t_{44} — aktywność regulatorowa NF κ B, t_{63} — transkrypcja c-Fos i innych genów pod wpływem Elk). Wyniki przeprowadzonej symulacji przedstawione są na rysunku 3. Średnie uruchomienie tranzycji t_{19} , t_{44} oraz t_{63} chcemy maksymalizować.

Analizując pod tym względem tabelę wynikową symulacji można poczynić następujące obserwacje. Ekspresja genów pod wpływem Elk (pierwsza kolumna z prawej) przyjmuje wartość maksymalną dla czterech serii eksperymentów: przy braku knockoutu, tam gdzie był knockout CD28 i ICOS, tam gdzie knockoutem dotknięto tranzycje wejściowe dla CD28 oraz OX40 i tam gdzie knockoutem dotknięta została aktywacja ICOS i ekspresja OX40. Wspomniane tranzycje są na początku szlaków bez zamodelowanego wpływu na szlak MAPK, więc ich nieuwzględnienie w CAR-T nie ma wpływu na aktywność Elk.

Przyglądając się kolumnie dotyczącej ekspresji pod wpływem NF κ B można zaobserwować jedną wartość maksymalną dla knockoutu tranzycji wejściowej dla CD28 i tranzycji wejściowej dla ICOS. Wiąże się to z wyborem CD45 i OX40 na kandydatów



Rys. 2. Graficzna reprezentacja utworzonego modelu z zaznaczonym podziałem na regiony, będącym ułatwieniem przy opisaniu sieci. Do każdego regionu przypisano etykietę w postaci litery: A — transdukcja sygnału bezpośrednio poniżej receptora TCR, B — regulacja aktywności kinazy Lck, C — szlak PI3K, D — szlak wapniowy, E — szlak PKC θ , F — szlak MAPK, G — szlak OX40



Rys. 3. Tabela przedstawiająca średnią częstość uruchomienia wybranych tranzycji zaokrągloną do trzech cyfr znaczących. Im wspomniana wartość jest większa tym bardziej intensywny jest kolor komórki. Każdy wiersz odpowiada innemu knockoutowi, a każda kolumna innej badanej tranzycji (t_{19} — proliferacja i przeżycie limfocytu T (marker IL2), t_{44} — aktywność regulatorowa NF κ B (marker NF κ B wewnątrz jądra komórkowego), t_{63} — transkrypcja c-Fos i innych genów pod wpływem Elk (marker ufosforylowane Elk)). Każdy knockout można interpretować jako nie wybranie domen z danych receptorów do konstruktu CAR-T. Rozważane receptory to: CD28 (t_{69} — pojawienie się CD28 na błonie komórkowej), ICOS (t_{77} — aktywacja ICOS), CD45 (t_{97} — aktywacja CD45) oraz OX40 (t_{134} — ekspresja OX40).

na donorów domen do CAR-T. Rozważana tranzycja wyjściowa, przy takich ustawieniach knockoutu, nawet częściej się uruchamiała niż w przypadku braku jakichkolwiek knockoutów.

Częstość uruchomień t_{19} (proliferaacja i przeżycie komórki) jest szczególnie istotna, gdyż jest to bardzo ważna tranzycja z punktu widzenia aktywacji limfocytów T. Maksymalna wartość średniej częstości uruchomień jest widoczna dla knockoutu t_{69} (tranzycja wejściowa dla CD28) i t_{134} (tranzycja wejściowa dla OX40). Natomiast wartość minimalna jest osiągana przy wyborze CD28 i OX40 na donory domen kostymulacyjnych.

Podsumowując analizę na podstawie serii eksperymentów symulacyjnych z knockoutami, można wywnioskować, że niewybranie CD28 oraz niewybranie ICOS daje najlepsze rezultaty aktywacji markerów. Proponuje się zatem CD45 i OX40 jako donory domen kostymulujących do receptora CAR-T.

5. Wyznaczanie zbioru MPS

Analizę minimalnych zbiorów prekursorów przeprowadzono przy użyciu narzędzia *precursor* [1] dla sieci Petriego zdefiniowanej wcześniej w tej pracy, z automatycznie wyznaczonym zbiorem potencjalnych źródeł oraz zbiorem trzech markerów docelowych (p_{32} , p_{50} , p_{68}). Aby uruchomić narzędzie konieczne było posłużenie się maszyną wirtualną (Ubuntu 16.04, Python 3.8.20). Narzędzie wyznaczyło automatycznie 3 potencjalne źródła: p_{32} , p_{91} , p_{93} .

Spośród trzech zdefiniowanych markerów docelowych dwa (p_{50} , p_{32}) okazały się produkowalne z wyznaczonego zbioru źródeł, natomiast jeden (p_{68}) został uznany za nieprodukowalny w ramach zastosowanego modelu propagacji. Dla dwóch produkowalnych markerów docelowych narzędzie wyznaczyło minimalną licznosc zbioru prekursorów równą 2, a następnie wyznaczyło wszystkie zbiory prekursorów o tej minimalnej liczności, których znaleziono także dwa. Są one przedstawione w tabeli 4.

Tabela 4

Zbiory prekursorów o minimalnej liczności.		
Nr	Zbiór prekursorów	Nazwa biologiczna
1	$\{p_{32}, p_{93}\}$	{IL-2, CTLA4 }
2	$\{p_{32}, p_{91}\}$	{IL-2, dimer $\text{TCR}\alpha$ $\text{TCR}\beta$ }

Oba zidentyfikowane zbiory zawierają element p_{32} , co sugeruje, że IL-2 jest niezbędna do aktywacji limfocytu w odniesieniu do badanej sieci. Pozostała pozycja w znalezionych zbiorach wypełniana jest przez p_{91} lub p_{93} . Mimo, iż narzędzie *precursor* zwróciło mało wyników, to wytypowane elementy stanowią rdzeń biologicznych procesów odpowiedzialnych za aktywację limfocytu T.

6. Zestawienie metod

Wyniki uzyskane za pomocą obu zastosowanych podejść, tj. symulacyjnej analizy knockoutów na sieci Petriego oraz strukturalnej analizy MPS, nie powinny być traktowane jako konkurencyjne czy wzajemnie wykluczające się, lecz jako uzupełniające się spojrzenia na tę samą sieć sygnałową na różnych poziomach abstrakcji. Analiza sieci Petriego pozwala na zbadanie dynamiki procesu transdukcji sygnału, z uwzględnieniem częstości i konkurencji szlaków. Z drugiej strony analiza MPS skupia się bardziej na aspektach strukturalnych, umożliwiając analizę osiągalności węzłów. Zestawienie wszystkich wyników pozwala wskazać, w jaki sposób obie metody mogłyby się wzajemnie uzupełniać oraz jakie są ich ograniczenia.

Największa obserwowana rozbieżność pomiędzy metodami, wynika z faktu, iż żaden z czterech receptorów kostymulujących rozważanych w analizie symulacyjnej ($D = \{\text{CD28}, \text{ICOS}, \text{CD45}, \text{OX40}\}$) nie znalazł się wśród trzech wyznaczonych automatycznie przez narzędzie *precursor*. Zastosowana procedura autodetekcji źródeł wyznacza je na podstawie topologii całej sieci (węzły bez łuków wejściowych), nie zaś na podstawie zbioru D interesującego nas z perspektywy projektowania receptora CAR-T. Oznacza to, że przeprowadzona analiza MPS (w obecnej postaci) odpowiada na inne pytanie niż analiza symulacyjna. Mimo iż analiz tych nie da się bezpośrednio porównać,

to obie pozostają względem siebie komplementarne.

Najbardziej wyróżniającą się obserwacją jest status węzła p_{32} (IL-2): jest on równocześnie jednym z trzech zdefiniowanych markerów docelowych oraz jedynym elementem obecnym w dwóch wyznaczonych zbiorach prekursorów (tabela 4). Wynik ten dopuszcza dwie odmienne interpretacje, których na podstawie samej analizy MPS nie sposób rozstrzygnąć. Z jednej strony może odzwierciedlać rzeczywisty mechanizm biologiczny, istnieje bowiem autokrynną pętlę sprzężenia zwrotnego IL-2, w której IL-2 wydzielana przez limfocyt wiąże się z własnym receptorem (IL-2R), wzmacniając dalszą transkrypcję i wspierając proliferację (co ma duże wsparcie w literaturze [11]). Z drugiej strony, dokładana analiza sieci Petriego implikuje, że IL-2 mogła zostać zaklasyfikowana jako własny prekursor dlatego, że jest zależna od cyklu, leżącego na styku dwóch szlaków: wapniowego oraz PI3K, co może wskazywać na zależność interakcji krzyżowej (cross-talk) tych szlaków, czego nie udało się oddać, przy ograniczonej liczności kanonicznego zbioru prekursorów. Istnieją istotne prace w literaturze, które traktują o istotności tej interakcji [22]. Analiza knockoutów pary t_{69} , t_{134} daje najbardziej zbliżoną średnią uruchomień do średniej z symulacji bez knockoutów, co pokazuje, że zachowanie t_{97} - aktywacja CD45 oraz zachowanie aktywacji ICOS (t_{77}), są powiązane z tymi dwoma szlakami. I tak rzeczywiście jest - aktywacja ICOS jest bardzo ważna dla uruchomienia szlaku PI3K, natomiast aktywacja CD45 wywołuje kaskadę zdarzeń prowadzącą w konsekwencji do aktywacji szlaku wapniowego. Badania eksperymentalne wskazują, że interakcja krzyżowa między szlakami wapniowym oraz Akt/PI3K zapewnia komórce sygnały promujące przeżywanie [13], co jest zdefiniowane jako mechanizm działania IL-2 w tranzycji t_{19} - proliferacja i przeżycie limfocyty T.

Marker p_{68} (ufosforylowane Elk) został uznany za nieprodukowalny z wyznaczonego zbioru siedmiu źródeł. Wynik ten koresponduje z obserwacją z analizy symulacyjnej, gdzie częstość uruchomienia t_{63} pozostawała na zbliżonym poziomie niezależnie od tego, które z receptorów z D poddano knockoutowi. Wobec tego zachodzi uzasadnione podejrzenie, że szlak MAPK/Elk jest za bardzo odizolowany od sygnałów dochodzących od receptorów kostymulujących. Ten wynik pokazuje potencjalne punkty do rozbudowy modelu.

7. Podsumowanie

Zestawione wyniki pokazują, że obie metody kompensują wzajemnie swoje ograniczenia, nie zaś konkurują o trafność. Symulacja sieci Petriego w naturalny sposób uwzględnia cykle, konkurencję o zasoby oraz potencjalne rozróżnienie na aktywację oraz inhibicję, lecz jej ograniczeniem jest brak automatycznego wskazania, które węzły są strukturalnie krytyczne dla danego markera. MPS, mimo wykazanych ograniczeń związanych z analizą cykli, pozwala wskazać strukturalny szkielet konieczny do osiągnięcia danego markera oraz potencjalnie ujawnić redundantne trasy sygnałowe, których identyfikacja w oparciu jedynie o analizę topologiczną diagramu mogłaby nie być oczywista.

Na podstawie przeprowadzonego zestawienia proponujemy trzy konkretne kierunki dla dalszych prac. Obecna wersja modelu aktywacji limfocyty T spełnia nasze podstawowe wymagania, ale rozbudowa modelu o dodatkowe procesy anergii oraz deaktywacji może pozwolić na lepsze zrozumienie niepożądanych efektów działania wybranych zestawów domen sygnałowych. Konieczne jest też powtórzenie analizy MPS z po-

czątkowym zbiorem receptorów (a nie autodetekcją) jako zbiorem źródłowym, w celu uzyskania wyników bezpośrednio porównywalnych z analizą symulacyjną. Ciekawym kierunkiem integracji metod jest rozdzielenie zbioru docelowego T na markery pożądane (aktywacja) i niepożądane (przykład może stanowić marker anergii limfocytu T – $DGK\alpha$) oraz analiza ich osobno w oparciu o metody znajdowania MPS, aby uniknąć mieszania ścieżek o przeciwnym znaczeniu biologicznym. Na podstawie sieci Petriego można by analizować jednocześnie oba rodzaje procesów, a połączenie tych dwóch podejść daje szansę na wiarygodną ocenę kombinacji domen wewnątrzkomórkowych podczas projektowania eksperymentalnych receptorów chimerycznych.

LITERATURA

1. Thiele S.: Precursor: Compute minimal precursors sets that enable the production of target metabolites. <https://github.com/bioasp/precursor>.
2. Acuña V., Milreu P. V., Cottret L., Marchetti-Spaccamela A., Stougie L., Sagot M.-F.: Algorithms and complexity of enumerating minimal precursor sets in genome-wide metabolic networks. *Bioinformatics*, 2012, Vol.28(19), p. 2474–2483.
3. Andrade R., Wannagat M., Klein C. C., Acuña V., Marchetti-Spaccamela A., Milreu P. V., Stougie L., Sagot M.-F.: Enumeration of minimal stoichiometric precursor sets in metabolic networks. *Algorithms for Molecular Biology*, 2016, Vol.11(1), p. 25.
4. Beals C. R., Sheridan C. M., Turck C. W., Gardner P., Crabtree G. R.: Nuclear export of nf-atc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science*, 1997, Vol.275(5308), p. 1930–1933.
5. Beecham E. J., Ma Q., Ripley R., Junghans R. P.: Coupling cd28 co-stimulation to immunoglobulin t-cell receptor molecules: the dynamics of t-cell proliferation and death. *Journal of immunotherapy*, 2000, Vol.23(6), p. 631–642.
6. Bogacz A., Bukowska A., Bukowska M., Olbromski K., Łaba A., Klupieć R., Jopek K.: Modern immunotherapy using car-t cells in haemato-oncology and solid tumors. *Acta Haematologica Polonica*, 2024, Vol.55(1), p. 34–41.
7. Castellanos-Rueda R., Wang K.-L. K., Forster J. L., Driessen A., Frank J. A., Martínez M. R., Reddy S. T.: Dissecting the role of car signaling architectures on t cell activation and persistence using pooled screens and single-cell sequencing. *Science advances*, 2025, Vol.11(7), p. eadp4008.
8. Cottret L., Vieira Milreu P., Acuña V., Marchetti-Spaccamela A., Viduani Martinez F., Sagot M.-F., Stougie L.: Enumerating precursor sets of target metabolites in a metabolic network. *International Workshop on Algorithms in Bioinformatics*, 2008, p. 233–244.
9. Croft M.: Control of immunity by the tnfr-related molecule ox40 (cd134). *Annual review of immunology*, 2010, Vol.28(1), p. 57–78.
10. Daniels K. G., Wang S., Simic M. S., Bhargava H. K., Capponi S., Tonai Y., Yu W., Bianco S., Lim W. A.: Decoding car t cell phenotype using combinatorial signaling motif libraries and machine learning. *Science*, 2022, Vol.378(6625), p. 1194–1200.
11. Demaison C., Chastagner P., Moreau J.-L., Theze J.: Ligand-induced autoregulation of il-2 receptor α chain expression in murine t cell lines. *International immunology*, 1996, Vol.8(10), p. 1521–1528.

12. Dimitrov K., Merkle F., Dimitrov M., Merkle S., Hoover A., Bachanova V.: Major adverse events with chimeric antigen receptor t-cell therapy: presentation, diagnosis, and resuscitation. *Annals of Emergency Medicine*, 2025, Vol.87(2), p. 229–238.
13. Divolis G., Mavroeidi P., Mavrofrydi O., Papazafiri P.: Differential effects of calcium on pi3k-akt and hif-1 α survival pathways. *Cell biology and toxicology*, 2016, Vol.32(5), p. 437–449.
14. Ebinu J. O., Bottorff D. A., Chan E. Y., Stang S. L., Dunn R. J., Stone J. C.: Rasgrp, a ras guanyl nucleotide-releasing protein with calcium-and diacylglycerol-binding motifs. *Science*, 1998, Vol.280(5366), p. 1082–1086.
15. Eker S., Krummenacker M., Shearer A. G., Tiwari A., Keseler I. M., Talcott C., Karp P. D.: Computing minimal nutrient sets from metabolic networks via linear constraint solving. *BMC bioinformatics*, 2013, Vol.14(1), p. 114.
16. Eshhar Z., Waks T., Gross G., Schindler D. G.: Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and t-cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, Vol.90(2), p. 720–724.
17. Fan S., Kang B., Li S., Li W., Chen C., Chen J., Deng L., Chen D., Zhou J.: Exploring the multifaceted role of rasgrp1 in disease: immune, neural, metabolic, and oncogenic perspectives. *Cell Cycle*, 2024, Vol.23(6), p. 722–746.
18. Formanowicz D., Kozak A., Głowacki T., Radom M., Formanowicz P.: Hemojuvelin–hepcidin axis modeled and analyzed using petri nets. *Journal of biomedical Informatics*, 2013, Vol.46(6), p. 1030–1043.
19. Gebser M., König A., Schaub T., Thiele S., Veber P.: The bioasp library: Asp solutions for systems biology. 2010 22nd IEEE International Conference on Tools with Artificial Intelligence, 2010, p. 383–389.
20. Gebser M., Schaub T., Thiele S.: Gringo: A new grounder for answer set programming. *International Conference on Logic Programming and Nonmonotonic Reasoning*, 2007, p. 266–271.
21. Genot E., Cantrell D. A.: Ras regulation and function in lymphocytes. *Current opinion in immunology*, 2000, Vol.12(3), p. 289–294.
22. Gutiérrez A., Contreras C., Sánchez A., Prieto D.: Role of phosphatidylinositol 3-kinase (pi3k), mitogen-activated protein kinase (mapk), and protein kinase c (pkc) in calcium signaling pathways linked to the α 1-adrenoceptor in resistance arteries. *Frontiers in physiology*, 2019, Vol.10, p. 55.
23. Hermiston M. L., Xu Z., Weiss A.: Cd45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual review of immunology*, 2003, Vol.21(1), p. 107–137.
24. Imieliński M., Belta C., Rubin H., Halász Á.: Systematic analysis of conservation relations in escherichia coli genome-scale metabolic network reveals novel growth media. *Biophysical journal*, 2006, Vol.90(8), p. 2659–2672.
25. Liao W., Lin J.-X., Leonard W. J.: Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*, 2013, Vol.38(1), p. 13–25.
26. Liu S. K., Fang N., Koretzky G. A., McGlade C. J.: The hematopoietic-specific adaptor protein gads functions in t-cell signaling via interactions with the slp-76 and lat adaptors. *Current Biology*, 1999, Vol.9(2), p. 67–75.

27. Murata T.: Petri nets: Properties, analysis and applications. *Proceedings of the IEEE*, 1989, Vol.77(4), p. 541–580.
28. Oh-hora M., Rao A.: Calcium signaling in lymphocytes. *Current opinion in immunology*, 2008, Vol.20(3), p. 250–258.
29. Patel K. K., Tariveranmoshabad M., Kadu S., Shobaki N., June C.: From concept to cure: The evolution of car-t cell therapy. *Molecular Therapy*, 2025, Vol.33(5), p. 2123–2140.
30. Radom M., Rybarczyk A., Szawulak B., Andrzejewski H., Chabelski P., Kozak A., Formanowicz P.: Holmes: A graphical tool for development, simulation and analysis of petri net based models of complex biological systems. *Bioinformatics*, 2017, Vol.33(23), p. 3822–3823.
31. Romero P., Karp P.: Nutrient-related analysis of pathway/genome databases. *Bio-computing 2001 World Scientific*, 2000, p. 471–482.
32. Shah K., Al-Haidari A., Sun J., Kazi J. U.: T cell receptor (tcr) signaling in health and disease. *Signal transduction and targeted therapy*, 2021, Vol.6(1), p. 412.
33. Smith-Garvin J. E., Koretzky G. A., Jordan M. S.: T cell activation. *Annual review of immunology*, 2009, Vol.27(1), p. 591–619.
34. Song J., So T., Croft M.: Activation of $\text{nf-}\kappa\text{b1}$ by ox40 contributes to antigen-driven t cell expansion and survival. *The Journal of Immunology*, 2008, Vol.180(11), p. 7240–7248.
35. Štefanová I., Hemmer B., Vergelli M., Martin R., Biddison W. E., Germain R. N.: Tcr ligand discrimination is enforced by competing erk positive and shp-1 negative feedback pathways. *Nature immunology*, 2003, Vol.4(3), p. 248–254.
36. Sun L., Deng L., Ea C.-K., Xia Z.-P., Chen Z. J.: The traf6 ubiquitin ligase and tak1 kinase mediate ikk activation by bcl10 and malt1 in t lymphocytes. *Molecular cell*, 2004, Vol.14(3), p. 289–301.
37. Tomasik J., Jasiński M., Basak G. W.: Next generations of car-t cells-new therapeutic opportunities in hematology? *Frontiers in immunology*, 2022, Vol.13, p. 1034707.
38. Ussowicz M., Ślęzak A., Myszka-Kozłowska M., Gajek K., Jopek K., Bukowska M., Bukowska A., Jureczek J., Jarmużek W., Litwin M., others : Hospital exemption use of virus-specific t-lymphocytes in children: early experience within the allovista clinical trial framework. *Frontiers in Immunology*, 2026, Vol.17, p. 1805803.
39. Vandenborre K., Van Gool S., Kasran A., Ceuppens J., Boogaerts M., Vandenbergh P.: Interaction of ctla-4 (cd152) with cd80 or cd86 inhibits human t-cell activation. *Immunology*, 1999, Vol.98(3), p. 413–421.
40. Weil R., Israel A.: Deciphering the pathway from the tcr to $\text{nf-}\kappa\text{b}$. *Cell Death & Differentiation*, 2006, Vol.13(5), p. 826–833.
41. Zugasti I., Espinosa-Aroca L., Fidyk K., Mulens-Arias V., Diaz-Beya M., Juan M., Urbano-Ispizua Á., Esteve J., Velasco-Hernandez T., Menéndez P.: Car-t cell therapy for cancer: current challenges and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2025, Vol.10(1), p. 210.