

Magdalena OCHAB, Krzysztof PUSZYNSKI
Politechnika Śląska

ZASTOSOWANIE DYSKRETNYCH MODELI WPLYWU FLUKTUACJI CZĄSTECZEK REGULATORYWYCH NA PROCESY KOMÓRKOWE

Streszczenie

Przybliżenie deterministyczne w modelowaniu losowych procesów wewnątrzkomórkowych jest sporym uproszczeniem, szczególnie w przypadku oddziaływań pomiędzy małolicznymi reagentami. Procesy komórkowe są ściśle uzależnione od poziomu cząsteczek regulatorowych, który jest stosunkowo niski i może ulegać znaczącym fluktuacjom. W niniejszym artykule zaproponowaliśmy różne modele regulacji poziomu liczby aktywnych enzymów w komórce oraz sprawdziliśmy jaki wpływ ma szum stochastyczny ich poziomu na poziom białka zależnego od tych enzymów.

APPLICATION OF DISCRETE MODELS OF THE INFLUENCE OF REGULATORY MOLECULES' FLUCTUATIONS ON CELLULAR PROCESSES

Summary.

Deterministic approximation in the modeling of random intracellular processes is a significant simplification, especially in the case of interactions between small numbers of reagents. Cellular processes are closely dependent on the level of regulatory molecules, which is relatively low and can undergo significant fluctuations. In this article, we proposed a few models of regulation of the amount of active enzymes in the cell and we checked what effect their stochastic noise has on the level of protein dependent on these enzymes.

1. Wprowadzenie

Modelowanie procesów biologicznych, takich jak procesy wewnątrzkomórkowe jest prężnie rozwijającą się dziedziną z pogranicza biologii, matematyki i inżynierii systemów [1]. Zdecydowana większość modeli procesów wewnątrzkomórkowych to modele deterministyczne [2], pomijające element losowości obecny w rzeczywistych układach. Reakcje wewnątrzkomórkowe, podobnie jak wszystkie reakcje chemiczne, są uzależnione od losowego zderzenia się cząsteczek, które może wywołać reakcję i powstanie danego produktu. Ponadto liczba cząsteczek danej substancji w komórce może być różnego rzędu: od kilku do kilkudziesięciu a nawet kilkuset tysięcy molekuł, a ich lokalne stężenia wewnątrz komórki mogą znacząco różnić się od siebie. Dlatego też założenie o równym stężeniu w całej objętości komórki i pomijanie losowości procesów może powodować duże niedokładności. Rozpatrywanie układów biologicznych jako układów

dyskretnych, z określoną liczbą cząsteczek w danym czasie, z losowymi, skokowymi przejściami pomiędzy stanami w danych chwilach czasu pozwala na dokładniejsze odwzorowanie zachowania układów biologicznych [1].

Wśród ogromnej różnorodności procesów zachodzących we wnętrzu komórek można wytypować kilka podstawowych, które mają wpływ na zmianę liczby danej formy białka w komórce. Są to: produkcja, degradacja (rozkład), aktywacja i dezaktywacja. Białka w komórce pełnią niezwykle ważne i różnorodne funkcje. Są cząsteczkami budulcowymi, regulatorowymi, enzymatycznymi a także transportowymi, przez co odpowiadają za prawidłowe funkcjonowanie całego organizmu, a utrzymywanie ich odpowiedniego poziomu jest kluczowym procesem wewnątrzkomórkowym. Produkcja białka jest procesem kilkietapowym. Komórka zawiera informację genetyczną na temat budowy danego białka w cząsteczce DNA, czyli genie. Proces aktywacji genów jest wieloetapowy i wymaga obecności wielu różnych cząsteczek regulatorowych takich jak czynniki transkrypcyjne oraz enzymy. Najczęściej zakłada się, że gen zmienia swój stan z nieaktywnego na aktywny, gdy do tzw. obszaru promotora genu przyłączy się odpowiednie białko lub kompleks białek będący czynnikiem transkrypcyjnym tego genu. Sam proces przyłączania i odłączania się czynnika transkrypcyjnego od obszaru promotora, jak również tworzenie się kompleksów białek będących czynnikami transkrypcyjnymi jest silnie uzależniony od obecności odpowiednich enzymów. Aktywny gen służy jako matryca w procesie transkrypcji, czyli produkcji mRNA. mRNA odpowiednio zmodyfikowane i przetransportowane do cytoplazmy, służy jako bezpośrednia matryca do produkcji białka w procesie translacji. Nowostworzone białko przechodzi obróbkę potranslacyjną, której rezultatem jest powstanie białka pełnofunkcjonalnego. Zdecydowana większość procesów wewnątrzkomórkowych nie zachodzi samoczynnie, ale musi być aktywowana przez różnego typu cząsteczki regulatorowe [3].

Tworząc modele procesów biologicznych autorzy, ze względu na małą dostępność danych biologicznych, niejednokrotnie zakładają, że liczba cząsteczek regulatorowych jest stała, a w efekcie tempo danej reakcji jest również stałe [4], [5]. Uproszczenie takie jest uzasadnione w przypadku idealnie wymieszanego, jednolitego środowiska z bardzo dużą liczbą cząsteczek regulatorowych. W rzeczywistości środowisko wewnątrzkomórkowe jest bardzo heterogeniczne, a poziomy cząsteczek regulatorowych mogą ulegać znacznym fluktuacjom. Problem ten został szerzej omówiony w pracy de Franciscis i współ. [6]. W niniejszym artykule pokazemy, że uwzględnienie wpływu szumów stochastycznych wynikających z fluktuacji liczby cząsteczek regulatorowych skutkuje zmianą zachowania układu.

2. Modelowanie poziomu enzymów

Cząsteczki regulatorowe, takie jak enzymy, często występują w układach biologicznych w stanie nieaktywnym, a swoje właściwości regulowania procesów nabywają dopiero po aktywacji, najczęściej na drodze fosforylacji. Z tego powodu tempo reakcji będzie uzależnione od liczby aktywnych cząsteczek, a nie od ich całkowitej liczby. Proces aktywacji enzymów ma kluczowe znaczenie dla funkcjonowania komórki, a badania w tym temacie są prowadzone już od wielu lat [7]. W poniższych modelach zakładamy stałą pulę czynników regulatorowych w układzie, przyjmując że tempa reakcji ich produkcji i degradacji są takie same. Źródłem zmienności liczby aktywnych cząsteczek

w układzie jest proces aktywacji oraz deaktywacji cząsteczek, który jak wspomniano wcześniej ma naturę stochastyczną. Nawet przy założeniu braku autoregulacji poziomu aktywnych enzymów, stochastyczne fluktuacje wywołują szum, który będzie istotnie wpływał na tempo procesów zależnych od poziomu aktywnej formy białka. Jednocześnie w zależności od typu regulacji poziomu enzymów, możliwe jest występowanie różnych rozkładów prawdopodobieństwa liczby aktywnych cząsteczek enzymu w układzie.

We wszystkich stworzonych modelach zakładamy stałą liczbę cząsteczek regulatorowych, enzymów ($N = 1\ 000$) oraz dwa stany: aktywny (X) oraz nieaktywny (Y), przy czym $Y = N - X$.

Model A: jest modelem ze spontaniczną aktywacją i deaktywacją enzymu i brakiem autoregulacji (Rys. 1 (A1)). Skłonności reakcji występujących w układzie zależą liniowo od stanu układu. Przyjmujemy oznaczenia: r_1 to skłonność reakcji aktywacji, natomiast r_2 to skłonność reakcji deaktywacji:

$$r_1 = k_1 \cdot (N - X) \quad (1)$$

$$r_2 = k_2 \cdot X, \quad (2)$$

gdzie $N - X$ to liczba cząsteczek nieaktywnych. Wartości parametrów zebrane zostały w tabeli 1. Zostały one tak dobrane by średni poziom aktywnych cząsteczek wynosił połowę ich całkowitej liczby. Spontaniczna aktywacja i deaktywacja enzymów skutkuje nieregularnymi oscylacjami wokół stanu równowagi, w którym połowa cząsteczek jest w stanie aktywnym ($X_s = 500$), co obrazuje przebieg czasowy liczby aktywnych enzymów przedstawiony na rys. 1 (A2). Empiryczny rozkład prawdopodobieństwa istnienia X cząsteczek aktywnych w danej chwili czasu, wyznaczony na podstawie 80 tys. godzin symulacji poziomu enzymów jest zbliżony kształtem do rozkładu normalnego z wartością oczekiwaną równą 500 (rys. 1 (A3)).

Model B: jest modelem, w którym oprócz spontanicznych przełączeń występują dwie pętle sprzężenia dodatniego zgodnie ze schematem przedstawionym na rys. 1 (B1). Dodatnie sprzężenia zwrotne niezwykle często są spotykane w układach biologicznych, ponieważ pozwalają na wystąpienie kilku stanów równowagi ([8], [9]) Spontaniczne reakcje aktywacji i dezaktywacji mają skłonności opisane podobnie jak w modelu A (r_1 oraz r_2), dodatkowo skłonność r_3 opisuje sprzężenie dodatnie na aktywację enzymu: aktywny enzym wzmacnia dalszą aktywację cząsteczek, natomiast sprzężenie dodatnie na deaktywację enzymu jest opisane przez skłonność r_4 - enzym w formie nieaktywnej wzmacnia deaktywację.

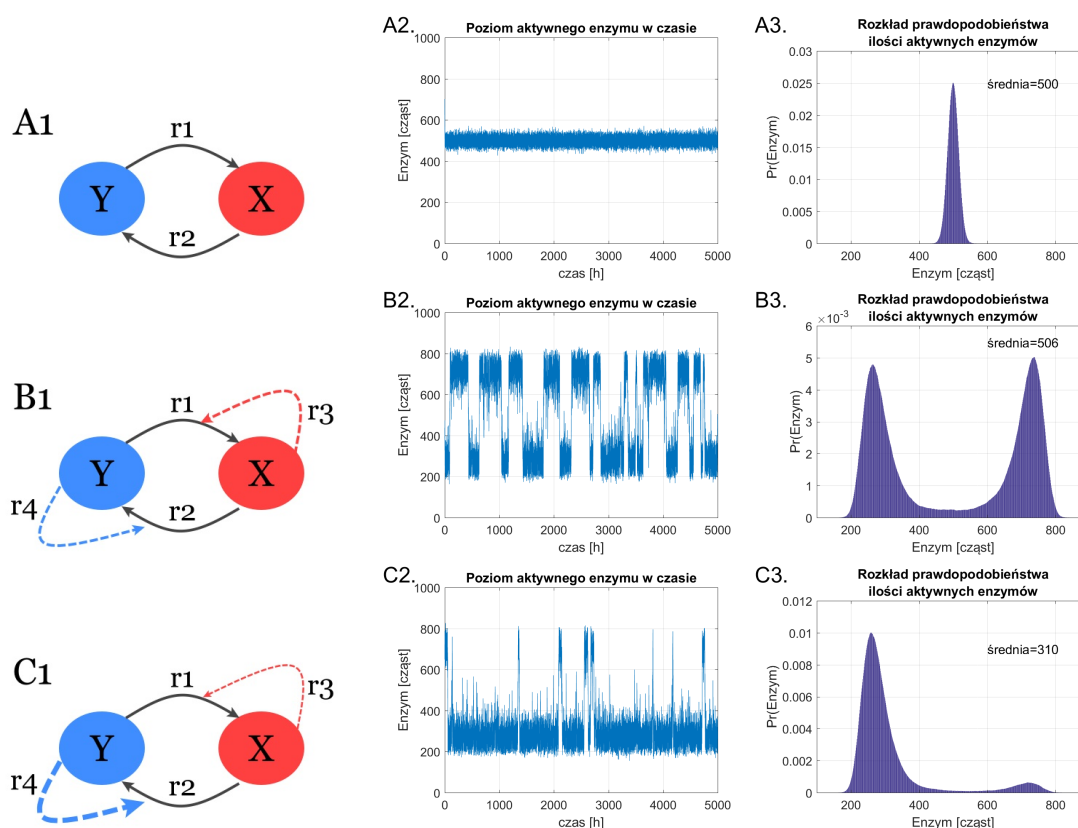
$$r_3 = k_3 \cdot \frac{X^n}{K_X^n + X^n} \cdot (N - X) \quad (3)$$

$$r_4 = k_4 \cdot \frac{(N - X)^m}{K_Y^m + (N - X)^m} \cdot X \quad (4)$$

(reakcje r_1 oraz r_2 jak w modelu A). Parametry wykorzystane w funkcjach Hilla do opisanego powyższych zależności są przedstawione w tabeli 1. Układ może występować w dwóch różnych stanach - o wysokiej lub niskiej liczby aktywnych cząsteczek, co w przebiegu czasowym można zaobserwować jako fluktuacje układu wokół dwóch punktów stacjonarnych (rys. 1 (B2)). Empiryczny rozkład prawdopodobieństwa istnienia X

cząstek aktywnych w danej chwili czasu w czasie symulacji jest rozkładem dwumodalnym (rys. 1 (B3)) o średniej równej w przybliżeniu 500, podobnie jak w modelu A, ale o znacznie większym odchyleniu standardowym.

Model C: posiada schemat modelu identyczny jak w przypadku modelu B, przy czym tempa reakcji opisujących sprzężenia zwrotne nie są takie same (rys. 1 (C1)). Skłonności reakcji są opisane takimi samymi formułami, ale wartości parametrów reakcji są inne niż w modelu B. Model ten ma bardziej realistycznie oddawać sytuację obserwowaną w komórce, gdzie enzym występuje głównie w stanie nieaktywnym a jego aktywacja jest gwałtownym, ale krótkotrwałym procesem (rys. 1 (C2)). W efekcie histogram prawdopodobieństwa wystąpienia danej liczby aktywnego białka w czasie symulacji jest silnie niesymetryczny, z maksimum dla około 270 cząstek i drugim znacznie mniejszym maksimum przy około 750 aktywnych cząsteczkach (rys. 1 (C3)). Średnia liczba aktywnych cząstek w czasie symulacji to w przybliżeniu 310.



Rys. 1. Modele zmian poziomu aktywnych enzymów w komórce. A. Model bez autoregulacji. B. Model z dwoma sprzężeniami dodatnimi. C. Model z dwoma niesymetrycznymi sprzężeniami dodatnimi. (A1, B1, C1 - schemat modelu; A2, B2, C2 - przebieg czasowy liczby aktywnych cząstek; A3, B3, C3 - empiryczny rozkład prawdopodobieństwa liczby aktywnych cząstek w danej chwili czasu)

Tabela 1

Parametry opracowanych modeli

Model	Parametry
Model A	$k_1 = 5 \cdot 10^{-4}; k_2 = 5 \cdot 10^{-4}$
Model B	$k_1 = 5 \cdot 10^{-4}; k_2 = 5 \cdot 10^{-4}; K_X = 500; K_Y = 500$ $k_3 = 2.2 \cdot 10^{-5}; k_4 = 2.2 \cdot 10^{-5}; n = 3; m = 3$
Model C	$k_1 = 5 \cdot 10^{-4}; k_2 = 5 \cdot 10^{-4}; K_X = 500; K_Y = 500$ $k_3 = 0.99 * 2.2 \cdot 10^{-5}; k_4 = 2.2 \cdot 10^{-5}; n = 3; m = 3$

3. Wpływ szumów na produkcję białka

W celu uproszczenia modeli biologicznych, autorzy często zakładają stałą liczbę cząsteczek regulatorowych, co prowadzi do założenia stałego tempa danej reakcji. W zależności od reakcji takie założenie jest mniej lub bardziej zgodne z rzeczywistością. Przykładowo reakcja produkcji białka jest ściśle regulowana przez obecność czynników transkrypcyjnych. Fluktuacje ich poziomu bezpośrednio przekładają się na poziom danego białka w komórce.

Najprostszy, rozważany przez nas model produkcji białka zawiera dwie reakcje: produkcję (r_5) i degradację (r_6). Produkcja jest uzależniona od poziomu enzymu, przy czym w najprostszym przypadku zakładamy stały poziom jego aktywnej formy ($X = 500$). Zgodnie z obowiązującą wiedzą biologiczną zakładamy, że wpływ aktywnego enzymu na tempo reakcji można opisać funkcją Hilla:

$$r_5 = p \cdot \frac{X^2}{K_M^2 + X^2} \quad (5)$$

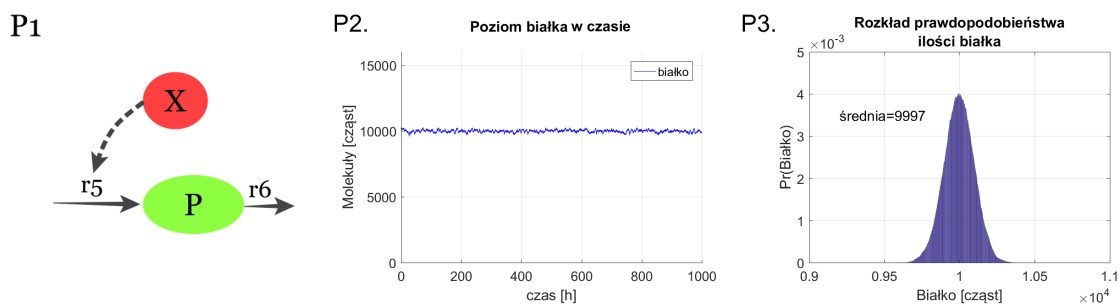
$$r_6 = d \cdot P, \quad (6)$$

gdzie P oznacza liczba białka. Wartość tempa degradacji została wyliczona przy założeniu czasu półtrwania białka równego około 2,5 godziny ($d = 8 \cdot 10^{-5}$), natomiast tempo produkcji zostało dopasowane tak, aby średni poziom białka w komórce był zbliżony do 10 000 cząsteczek ($p = 1.6$).

Schemat modelu przedstawiony jest na rys. 2. Na przebiegu czasowym można zaobserwować oscylacje wynikające z losowości procesu stochastycznego. Widoczny jest stosunkowo mały zakres zmian (rys. 2 (P2)), oscylujący wokół średniej równej w przybliżeniu 10 tys. cząsteczek białka w komórce (rys. 2 (P3)).

Model A: W tym modelu proces produkcji białka jest rozszerzony o równania opisujące liczbę aktywnych cząsteczek regulatorowych zaproponowane we wcześniejszej części artykułu. Szum wynikający z spontanicznych zmian stanu poprzez aktywację i deaktywację enzymu powoduje zwiększenie fluktuacji w układzie (por. rys. 2 (P3) i rys. 3 (A3)), przy jednoczesnym zachowaniu średniej liczby cząsteczek białka na zbliżonym poziomie (10 tys. cząsteczek). Rozkład prawdopodobieństwa ma kształt jednododalny (rys. 3 (A3)).

Model B: W tym przypadku zbadaliśmy wpływ szumu o rozkładzie dwumodalnym na produkcję białka. Przy założeniu istnienia autoregulacji poziomu enzymów w komórce, fluktuacje ich poziomu mogą mieć zdecydowanie większy wpływ na poziom



Rys. 2. Model produkcji białka ze stałym poziomem enzymów. (P1- schemat modelu; P2 - przebieg czasowy liczby cząsteczek białka; P3 - empiryczny rozkład prawdopodobieństwa liczby cząsteczek białka w danej chwili czasu)



Rys. 3. Model produkcji białka z fluktuacjami enzymów - model A. (A1- schemat modelu; A2 - przebieg czasowy liczby cząsteczek białka; A3 - empiryczny rozkład prawdopodobieństwa liczby cząsteczek białka w danej chwili czasu)

białka. Schemat takiego układu jest przedstawiony na rys. 4 (B1). W przebiegu czasowym widoczne są znacznie większe oscylacje poziomów białka niż w przypadkach poprzednich. Aktywny enzym może utrzymywać się w komórce przez dłuższy czas na wysokim lub niskim poziomie, co ma bezpośrednie przełożenie na występowanie znaczących zmian poziomu białka w komórce (rys. 4 (B2)). Rozkład prawdopodobieństwa liczby aktywnego enzymu w komórce jest symetryczny (patrz rys. 1 (B3)), natomiast histogram przedstawiający rozkład prawdopodobieństwa liczby białka jest również dwumodalny, ale silnie niesymetryczny. Pierwsze maksimum jest niższe i wstępuje przy bardzo niskich wartościach (5 tys. cząsteczek), natomiast drugie maksimum występuje przy 13.5 tys. cząsteczek, ale jest zdecydowanie wyższe (rys. 4 (B3)).

Model C: W kolejnym przypadku sprawdziliśmy wpływ niesymetrycznego szumu poziomu aktywnego enzymu na poziom białka w komórce. Przez zdecydowaną większość czasu liczba aktywnego enzymu jest na niskim poziomie a wzrost do wysokich wartości jest procesem gwałtownym i chwilowym (rys. 5 (C2)), co ma oddawać rzeczywiste zachowanie enzymów w komórce. Histogram poziomu białka w układzie jest dwumodalny z dużym maksimum dla niskich poziomów białka. Położenie maksimum jest podobne jak w modelu B, jednak ich wartość zdecydowanie się różni. W układzie przeważa stan z niskim poziomem białka, a jego wysokie poziomy są obserwowane epizodycznie (rys. 5 (C3)). Również średni poziom białka w układzie jest znacznie niższy (średnia modelu C jest równa 5 328 cząsteczek w porównaniu do modelu B gdzie



Rys. 4. Model produkcji białka z fluktuacjami enzymów - model B. (B1- schemat modelu; B2 - przebieg czasowy liczby cząsteczek białka; B3 - empiryczny rozkład prawdopodobieństwa liczby cząsteczek białka w danej chwili czasu)

wynosi 9 141).



Rys. 5. Model produkcji białka z fluktuacjami enzymów - model C. (C1- schemat modelu; C2 - przebieg czasowy liczby cząsteczek białka; C3 - empiryczny rozkład prawdopodobieństwa liczby cząsteczek białka w danej chwili czasu)

4. Podsumowanie

Wraz z rozwojem wiedzy biologicznej odnośnie procesów zachodzących we wnętrzu komórki pojawia się konieczność modyfikacji dotychczasowego podejścia do tworzenia ich modeli matematycznych. Założenie o stałym poziomie aktywnych cząsteczek regulatorowych może prowadzić do dużych uogólnień, skutkujących błędnymi wynikami. W niniejszym artykule najpierw rozpatrzyliśmy różne modele aktywacji i dezaktywacji enzymów. Już uwzględnienie wyłącznie losowych przełączeń między stanem aktywnym i nieaktywnym enzymu, bez żadnej autoregulacji, skutkuje powstaniem szumu, który będzie dodatkowo zwiększał zróżnicowanie poziomów białka w komórce przy zachowaniu tego samego średniego poziomu. W przypadku bardziej skomplikowanych modeli sieci białkowych, uwzględnienie losowości poziomów enzymów może skutkować powstaniem więcej niż jednego punktu stacjonarnego i przełączaniem się układu pomiędzy ich basenami przyciągania. W modelu B uwzględniliśmy dodatkowo autoregulację procesu aktywacji i dezaktywacji enzymu poprzez dwa sprzężenia zwrotne. Problem sprzężeń zwrotnych w układach biologicznych był wielokrotnie badany [10]. W efekcie rozkład prawdopodobieństwa liczby aktywnych cząsteczek enzymu jest dwumodalny i symetryczny, przy czym jego średnia wartość liczby aktywnych enzy-

mów jest równa średniej wartości modelu A. Histogram liczby białka w komórce w czasie symulacji w przypadku uwzględnienia szumu z modelu B ma kształt dwumodalny, a wysoki poziom białka bezpośrednio koreluje z wysokim poziomem enzymu w komórce (rys. 4 B2). Dwa maksima obserwowane na histogramie są mocno niesymetryczne. Niski poziom aktywnego enzymu powoduje bardzo duże obniżenie poziomu białka, przy czym zakres niskich wartości jest stosunkowo szeroki. Natomiast wysoki poziom aktywnego enzymu powoduje bardzo gwałtowny wzrost poziomu białka, przy czym zakres maksimum jest stosunkowo wąski. Warto zauważyć, iż w założonych modelach poziom aktywnego enzymu ma bezpośredni wpływ na tempo produkcji białka. Otwartym pozostaje pytanie na ile wprowadzenie rzeczywistych etapów produkcji białka (transkrypcji i translacji) “wygładzi” szumy wynikające z stochastycznej aktywacji i dezaktywacji enzymów. Autorzy zamierzają zbadać ten aspekt w najbliższej przyszłości.

Prace zostały częściowo sfinansowane ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer 02/010/PBU17/0091 (PBU/30/RAu1/2017/505) (KP) oraz BKM- 508 /RAU1/2017 (02/010/BKM17/0083) t. 6 (MO).

LITERATURA

1. Świerniak A., Kimmel M., Smieja J., Puszynski K., Psiuk-Maksymowicz k.: System Engineering Approach to Planning Anticancer Therapies. Springer-Verlag 2016, Doi: 10.1007/978-3-319-28095-0
2. Li Z., Ni M., Li J., Zhang Y., Ouyang Q., Tang C.: Decision making of the p53 network: Death by integration. *JTB*, 271, 2011, p. 205–211.
3. Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., et al.: *Essential Cell Biology, Fourth Edition*. Taylor and Francis Group; 2013.
4. Kardyńska M., Paszek A., Śmieja J., Spiller D., Widłak W., White M. R., et al.: Quantitative analysis reveals crosstalk mechanisms of heat shock-induced attenuation of NF- κ B signaling at the single cell level. *PLoS computational biology*, 14(4), 2018, e1006130.
5. Kozłowska E., Puszynski K.: Application of bifurcation theory and siRNA-based control signal to restore the proper response of cancer cells to DNA damage. *JTB*, 408, 2016, pp. 213-221.
6. De Franciscis S., Caravagna G., Mauri G., d’Onofrio A.: Gene switching rate determines response to extrinsic perturbations in the self-activation transcriptional network motif. *Scientific reports*, 6, 2016, 26980
7. DeWitt D.: Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1083(2), 1991, 121-134.
8. Xiong W., Ferrell Jr J. E.: A positive-feedback-based bistable ‘memory module’ that governs a cell fate decision. *Nature*, 426(6965), (2003) 460
9. Harris S., Levine, A.: The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17), (2005), 2899.
10. Thomas R., D’Ari R.: *Biological Feedback*. Taylor and Francis, Boston, 1990