



Πολυτεχνείο Κρήτης
Τμήμα Ηλεκτρονικών Μηχανικών
και Μηχανικών Υπολογιστών

Διπλωματική Εργασία στη Βιολογία Συστημάτων

**Προσομοίωση και εκτίμηση παραμέτρων σε δυναμικά μοντέλα:
Εφαρμογή στο μοντέλο Xenopus με χρήση του προγράμματος Simulink**

Θεοδωράτου Ευφροσύνη

Δεκέμβριος 2006
Χανιά

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα υπολογιστικά μοντέλα της κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης περιλαμβάνουν την ψηφιακή αναπαράσταση ενός σύνθετου δικτύου βιοχημικών αντιδράσεων ανάμεσα στα κύτταρα. Αυτές οι αντιδράσεις μπορούν να περιγραφούν από ένα σύστημα μη γραμμικών συνήθων διαφορικών εξισώσεων, σύμφωνα με τις αρχές της βιοχημικής κινητικής. Οι σταθερές ποσοστού εισάγονται ως παράμετροι στις διαφορικές εξισώσεις και πρέπει να υπολογιστούν έτσι ώστε να ταιριάζουν καλύτερα στα δεδομένα του πειράματος.

Στο πρώτο κεφάλαιο γίνεται μια εισαγωγή για τον τρόπο με τον οποίο η Βιολογία Συστημάτων άρχισε να αναπτύσσεται σαν ξεχωριστός κλάδος της Βιολογίας και για τις διάφορες μεθόδους μοντελοποίησης της ενδοκυτταρικής μεταγωγής σημάτων.

Το δεύτερο κεφάλαιο περιλαμβάνει αναφορές στη Μοριακή Κυτταρική Βιολογία (κύτταρο, DNA, πρωτεΐνες), έτσι ώστε να σχηματιστεί το αναγκαίο βιολογικό υπόβαθρο για την κατανόηση των βιολογικών διαδικασιών του μοντέλου.

Στο τρίτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα κύτταρα ως δυναμικά συστήματα, καθώς και ο καθορισμός και ο ρόλος των signaling pathways στη Βιολογία Συστημάτων.

Στο τέταρτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά στη Βιολογία Συστημάτων, έναν αναδυόμενο επιστημονικό τομέα, παρουσιάζεται η τρέχουσα έρευνα, οι τεχνικές μέτρησης που χρησιμοποιούνται και η τεχνική μοντελοποίησης των βιολογικών συστημάτων που επιλύονται από συνήθεις διαφορικές εξισώσεις, καθώς και ένα παράδειγμα μοντελοποίησης ενός signaling pathway.

Στο πέμπτο κεφάλαιο παρουσιάζεται το μοντέλο *Xenopus* και η προσομοίωση αυτού με το εργαλείο Simulink του Matlab. Γίνεται αναλυτική επεξήγηση του μοντέλου σε βιολογικό και σε μαθηματικό επίπεδο και παραθέτονται τα αποτελέσματα της προσομοίωσης.

Στο έκτο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της διαδικασίας εκτίμησης παραμέτρων του μοντέλου με τη βοήθεια του εργαλείου Simulink Parameter Estimation του Simulink.

Τα συμπεράσματα της προσομοίωσης και της εκτίμησης παραμέτρου παρουσιάζονται στο έβδομο κεφάλαιο και στο παράρτημα Α υπάρχει ο πίνακας με τις πειραματικές τιμές από τις οποίες εξήχθησαν οι τιμές παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την προσομοίωση του μοντέλου.

Περιεχόμενα

1	Εισαγωγή	1
2	Μοριακή Βιολογία Κυττάρων	3
2.1	Τα γονίδια και η σχέση τους με το DNA	3
2.2	Αντιγραφή του DNA	8
2.3	Η χρήση της γενετικής πληροφορίας	14
2.4	Οι πρωτεΐνες και ο ρόλος τους στο κύτταρο	18
2.5	Κυτταροδιαίρεση: Ο κύκλος των κυττάρων	22
3	Τα κύτταρα ως δυναμικά συστήματα	24
3.1	Τα κύτταρα ως συστήματα εισόδου-εξόδου	24
3.2	Signaling pathways	27
3.2.1	Ο λόγος της δημιουργίας των signaling pathways	27
3.2.2	Καθορισμός - προδιαγραφή του ρόλου των signaling pathways	29
3.2.3	Φωσφοροποίηση στα signaling pathways	31
4	Βιολογία Συστημάτων	33
4.1	Γενικά	33
4.2	Η βιολογία συστημάτων και η τεχνολογία	34
4.2.1	Τεχνικές μέτρησης	35
4.2.2	Περιορισμοί	39
4.3	Μοντέλα οργανισμών	40
4.4	Τρέχουσα έρευνα	41
4.5	Μοντελοποίηση – προσομοίωση	43
4.5.1	Τεχνική μοντελοποίησης	44
4.5.2	Παράδειγμα : Μοντελοποίηση του pathway μεταγωγής σήματος Ras/Raf-1/MEK/ERK	46
5	Το μοντέλο Xenopus	56
5.1	Γιατί ο Xenopus	56
5.1.1	Ιστορία	56
5.1.2	Xenopus	58
5.2	Βιολογικό και μαθηματικό υπόβαθρο του μοντέλου	59
5.2.1	Βιολογικό υπόβαθρο	59
5.2.1.1	Πρόωρη Εμβρυογένεση στους βατράχους	59
5.2.1.2	Γιατί εκχυλίσματα αυγών βατράχων;	60
5.2.1.3	Μηχανισμός της ρύθμισης του MPF	60
5.2.1.4	Αυτόνομη ταλάντωση της δραστηριότητας MPF	62
5.2.2	Μαθηματικό υπόβαθρο	63
5.2.2.1	Η εξίσωση των Michaelis-Menten	63
5.3	Το μοντέλο Xenopus	68
5.4	Προσομοίωση με Simulink	78
6	Εκτίμηση των παραμέτρων του μοντέλου Xenopus	87
6.1	Εκτίμηση των παραμέτρων με το Simulink Parameter Estimation	87
6.2	Μη γραμμικά ελάχιστα τετράγωνα	95
6.2.1	Ο αλγόριθμος	95

6.2.2 Η μέθοδος trust-region	97
6.3 Παρατηρήσεις	99
7 Συμπεράσματα	104
Βιβλιογραφία	105
Παράρτημα Α	107

Κατάλογος Σχημάτων

- 2.1 Δομή μιας νουκλεοτίδας
- 2.2 Μία ενιαία αλυσίδα DNA
- 2.3 Αρίθμηση των ατόμων μιας νουκλεοτίδας
- 2.4 Σύνδεση νουκλεοτίδων
- 2.5 Διπλός έλικας
- 2.6 Δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα ζευγάρια βάσεων
- 2.7 Πιθανοί τύποι δεσμών υδρογόνου
- 2.8 Δημιουργία δεσμών υδρογόνου
- 2.9 Λειτουργία της πρωτεΐνης SSB
- 2.10 Ζευγάρωμα των βάσεων
- 2.11 Λειτουργία της DNA πολυμεράσης III
- 2.12 Η αρίθμηση των ατόμων άνθρακα της δεοξυριβόζης
- 2.13 Η κατεύθυνση των αλυσίδων του DNA
- 2.14 Η διαδικασία αντιγραφής του DNA
- 2.15 Διαφορά ριβόζης και δεοξυριβόζης
- 2.16 Διαφορά θυμίνης και ουρακίλης
- 2.17 Πρόσδεση της RNA πολυμεράσης
- 2.18 Σύνθεση μίας αλυσίδας RNA
- 2.19 Δομή μιας πρωτεΐνης
- 2.20 Η πρωτεΐνη αιμογλοβίνη
- 2.21 Τα τέσσερα στάδια του κυτταρικού κύκλου
- 3.1 Το διάγραμμα σύνδεσης της ανάπτυξης λεπτομερούς σχεδίου κυκλώματος σημάτων του θηλαστικού κυττάρου
- 3.2 Επικοινωνία μεταξύ δύο κυττάρων
- 4.1 GFP
- 4.2 Σειρά γονιδίων
- 4.3 Κηλίδες Western
- 4.4 Διάβαση μεταγωγής σήματος Ras/Raf-1/MEK/ERK.
- 4.5 Το βασικό μπλοκ μοντελοποίησης των pathways. Το μοντέλο του pathway είναι κατασκευασμένο από βασικές αντιδράσεις όπως αυτή η αντίδραση κινητικού ενζύμου για την οποία απαιτείται ένα σύνολο τεσσάρων διαφορετικών εξισώσεων.
- 4.6 Γραφική αναπαράσταση του pathway μεταγωγής σημάτων Ras/Raf-1/MEK/ERK
- 4.7 Απεικόνιση της εκτίμησης παραμέτρου από δεδομένα μιας χρονικής σειράς: Κάθε παράμετρος καθορίζεται από την τιμή στην οποία συγκλίνουν οι εκτιμήσεις (απεικονίζεται με την οριζόντια γραμμή). (Σημειώστε ότι οποιοσδήποτε πειραματικός θόρυβος μπορεί να εξαλειφθεί περαιτέρω με τεχνικές παλινδρόμησης εάν πολλαπλές πειραματικές αντιγραφές είναι διαθέσιμες για κάθε χρονικό σημείο.)
- 4.8 Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης για σταθερούς αρχικούς όρους: (α) παρουσιάζεται η πρόσδεση του RKIP στο Raf-1*, (β) παρουσιάζεται η πρόσδεση του MEK-PP Το ERK-P, (γ) παρουσιάζεται η πρόσδεση του ERK-PP στο Raf-1*/RKIP, και (δ) παρουσιάζεται η πρόσδεση του RP στο RKIP-P.
- 4.9 Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης για μεταβλητούς αρχικούς όρους: (α) παρουσιάζεται η μεταβολή του Raf-1*, (β) παρουσιάζεται η μεταβολή του ERK, (γ) παρουσιάζεται η μεταβολή του RKIP, και (δ) παρουσιάζεται η μεταβολή του RKIP-P.
- 5.1 Το βιοχημικό σύστημα ελέγχου για την ενεργοποίηση του MPF στα εκχυλίσματα αυγών βατράχων.

- 5.2 Αυτόνομη ταλάντωση της δραστηριότητας MPF
- 5.3 Το διάγραμμα σύνδεσης του μοντέλου Xenopus
- 5.4 Πείραμα (Α) φωσφοροποίηση του MPF κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, όταν το Wee1 είναι περισσότερο ενεργό
- 5.5 Πείραμα (Β) φωσφοροποίηση του MPF κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όταν το Wee1 είναι λιγότερο ενεργό
- 5.6 Πείραμα (C) αποφωσφοροποίηση του preMPF κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, όταν το Cdc25 είναι λιγότερο ενεργό
- 5.7 Πείραμα (D) αποφωσφοροποίηση του preMPF κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όταν το Cdc25 είναι περισσότερο ενεργό
- 5.8 Πείραμα (Ε) φωσφοροποίηση του Cdc25 κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όταν ο MPF είναι περισσότερο ενεργός.
- 5.9 Πείραμα (F) αποφωσφοροποίηση του Cdc25 κατά τη διάρκεια της μεσόφασης
- 5.10 Πείραμα (G) φωσφοροποίηση του Wee1 κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όταν ο MPF είναι περισσότερο ενεργός
- 5.11 Πείραμα (H) αποφωσφοροποίηση του Wee1 κατά τη διάρκεια της μεσόφασης
- 5.12 Η προσομοίωση με Simulink της εξίσωσης (5.3)
- 5.13 Η προσομοίωση με Simulink της εξίσωσης (5.4)
- 5.14 Η προσομοίωση με Simulink της εξίσωσης (5.5)
- 5.15 Η προσομοίωση με Simulink της εξίσωσης (5.6)
- 5.16 Η προσομοίωση με Simulink της εξίσωσης (5.7)
- 5.17 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (Α).
- 5.18 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (Β).
- 5.19 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (C).
- 5.20 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (D).
- 5.21 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (Ε).
- 5.22 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (F).
- 5.23 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (G).
- 5.24 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (H).
- 6.1 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (Α), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.
- 6.2 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (Β), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.
- 6.3 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (C), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.
- 6.4 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (D), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.
- 6.5 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (Ε), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.
- 6.6 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (F), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.
- 6.7 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (G), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.
- 6.8 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (H), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.
- 6.9 Η συνάρτηση κόστους της παραμέτρου v'_d
- 6.10 Η συνάρτηση κόστους της παραμέτρου v''_d
- 6.11 Η συνάρτηση κόστους της παραμέτρου r_d
- 6.12 Η συνάρτηση κόστους της παραμέτρου v'_w

- 6.13 Η συνάρτηση κόστους της παραμέτρου v''_w
6.14 Η συνάρτηση κόστους της παραμέτρου r_w

Κατάλογος Πινάκων

- 5.1 Οι υπολογισμένες τιμές παραμέτρων και οι τιμές των αρχικών συνθηκών του μοντέλου
- 5.2 Τιμές παραμέτρων και αρχικές συνθήκες για κάθε πείραμα των Σχ. 5.4 - 5.11
- 6.1 Το εύρος των τιμών των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκτίμησή τους
- 6.2 Τιμές της αρχικής εκτίμησης των παραμέτρων του μοντέλου
- 6.3 Τελικές τιμές των παραμέτρων του μοντέλου
- A.1 Πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στο διαφορικό μοντέλο

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κάθε κύτταρο ενός (πολυκυτταρικού) οργανισμού κρατά το γονιδίωμα με ολόκληρο το γενετικό υλικό, που αντιπροσωπεύεται από ένα μεγάλο δίκλωνο μόριο DNA με τη διάσημη δομή διπλού έλικα. Τα κύτταρα είναι επομένως η θεμελιώδης μονάδα του θέματος διαβίωσης. Λαμβάνουν τις χημικές ουσίες από το περιβάλλον τους και τις μετασχηματίζουν. Οι λειτουργίες ενός κυττάρου είναι υπαγόμενες στον κανονισμό έτσι ώστε το κύτταρο να ενεργεί και να αλληλεπιδρά σε μια βέλτιστη σχέση με το περιβάλλον του. Το "κεντρικό δόγμα" της βιολογίας περιγράφει πώς οι πληροφορίες, που αποθηκεύονται μέσα στο DNA, μετασχηματίζονται σε πρωτεΐνες μέσω ενός ενδιάμεσου προϊόντος, αποκαλούμενο RNA. Η μεταγραφή (transcription) είναι η διαδικασία από την οποία κωδικοποιημένες περιοχές του DNA (αποκαλούμενα "γονίδια") συνθέτουν μόρια RNA. Αυτό ακολουθείται από μια διαδικασία που αναφέρεται ως "μετάφραση," συνθέτοντας τις πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας τις γενετικές πληροφορίες του RNA σαν ένα πρότυπο. Οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι ένζυμα και πραγματοποιούν τις αντιδράσεις που ευθύνονται για το μεταβολισμό του κυττάρου -- οι αντιδράσεις που του επιτρέπουν να επεξεργαστεί τις θρεπτικές ουσίες, να φτιάξει νέο κυτταρικό υλικό, να αναπτυχθεί και να διαιρεθεί.

Η έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη δεκαετία του '60 έδειξε ότι οι πιο βασικές κυτταρικές διαδικασίες είναι δυναμικές και ρυθμίζονται μέσω ανάδρασης. Ο έλεγχος του ρυθμού της πρωτεϊνικής σύνθεσης ήταν η πρώτη ένδειξη ότι τέτοιες διαδικασίες αντιμετωπίζονται καταλλήλότερα ως δυναμικά συστήματα [20].

Η σηματοδότηση των κυττάρων, ή η "μεταγωγή σημάτων," είναι η μελέτη των μηχανισμών που επιτρέπουν τη μεταφορά των βιολογικών πληροφοριών. Για τη μοντελοποίηση της ενδοκυτταρικής μεταγωγής σημάτων έχουν εμφανιστεί διάφορες μέθοδοι: συστήματα αντίδρασης που χρησιμοποιούν συνήθεις διαφορικές εξισώσεις [11], στοχαστικά μοντέλα [5], Petrinets [8], νευρωνικά δίκτυα [2], συστήματα κανόνων [3], και Boolean δίκτυα [19]. Σε αυτήν την διατριβή, ερευνάται το μοντέλο Xenopus έτσι όπως δημοσιεύτηκε από τον Solomon [15], γίνεται η προσομοίωσή του από τις συνήθεις διαφορικές εξισώσεις με τη βοήθεια του Simulink και γίνεται εκτίμηση των παραμέτρων

του μοντέλου με το εργαλείο Simulink Parameter Estimation. Το μοντέλο Xenopus είναι αρκετά απλό για να είναι εύκολα κατανοητό και αρκετά σύνθετο για να εξηγήσει τις πολλές προκλήσεις της προσαρμογής των μοριακών μηχανισμών της κυτταρικής συμπεριφοράς σε πραγματικά βιοχημικά και φυσιολογικά δεδομένα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΩΝ [4]¹

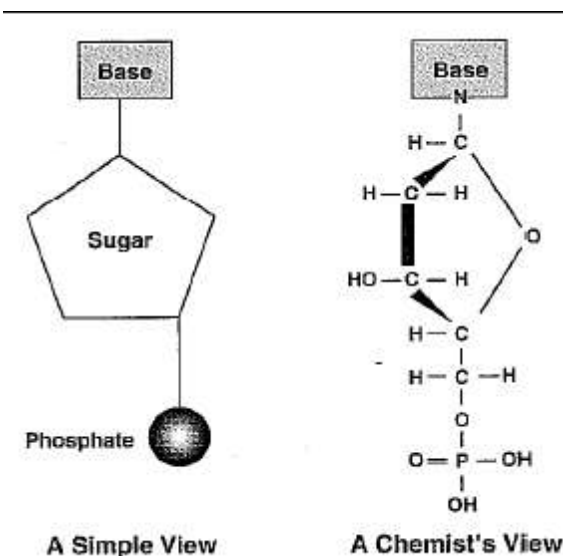
2.1 ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥΣ ΜΕ ΤΟ DNA

Οι βασικές αρχές της σύγχρονης γενετικής τοποθετήθηκαν όταν ο Mendel βρήκε ότι οι κληρονομικές πληροφορίες αποτελούνται από ιδιαίτερες θεμελιώδεις μονάδες που εμείς τώρα καλούμε γονίδια. Η ανακάλυψη ότι τα άτομα αποτελούνται από υποατομικά σωματίδια αναγγέλθηκε στην πυρηνική εποχή. Ομοίως, η αντίληψη ότι τα γονίδια αποτελούνται από μόρια που υπακούνε στους νόμους της χημείας έχει ανοίξει το δρόμο για μια βαθύτερη κατανόηση της ζωής και για την τεχνητή αλλαγή της από γενετικά εφαρμοσμένη μηχανική.

Η μονάδα της κληρονομικότητας είναι γνωστή ως γονίδιο. Κάθε γονίδιο είναι αρμόδιο για μία και μόνο κληρονομημένη ιδιότητα ή χαρακτηριστικό του οργανισμού. Ορισμένες ιδιότητες των υψηλότερων οργανισμών, όπως το ύψος ή το χρώμα του δέρματος, οφείλονται σε συνδυασμένη δράση πολλαπλών γονιδίων. Συνεπώς, σε αυτές τις περιπτώσεις υπάρχει μια διαβάθμιση της ιδιοκτησίας. Τέτοια πολυ-γονιδιακά χαρακτηριστικά αρχικά προκάλεσαν πολλή σύγχυση και είναι ακόμα δύσκολο να αναλυθούν, ειδικά εάν εμπλέκονται περισσότερα από δύο ή τρία γονίδια.

Τα γονίδια αποτελούνται από DNA, ή δεσοξυριβονουκλεϊνικό οξύ. Κάθε γονίδιο βρίσκεται στη γραμμική διάταξη και είναι ένα σημαντικό συστατικό δομών γνωστών ως χρωμοσώματα. Κάθε χρωμόσωμα έχει μερικά συμπληρωματικά πρωτεϊνικά μόρια που βοηθούν στο να διατηρεί τη δομή του και είναι ένα υπερβολικά μακρύ ενιαίο μόριο DNA. Το DNA του χρωμοσώματος διαιρείται σε τμήματα. Πολλά από αυτά τα τμήματα είναι πραγματικά γονίδια. Μπροστά από κάθε ένα γονίδιο είναι μια ρυθμιστική περιοχή DNA που εμπλέκεται στο αν το γονίδιο είναι 'ανοιχτό' ή 'κλειστό'. Μεταξύ των γονιδίων υπάρχουν μεγάλες περιοχές DNA συχνά αποκαλούμενες μεσογονιδιακές περιοχές. Το DNA είναι πολυμερές (μόριο από παρόμοιες επαναλαμβανόμενες μονάδες που συνδέονται μεταξύ τους

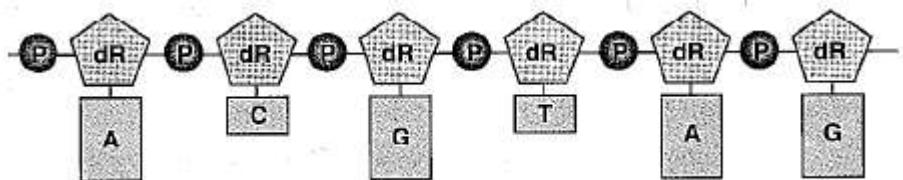
¹ Μετάφραση από [4]



Σχήμα 2.1 Δομή μιας νουκλεοτίδας, από [4]

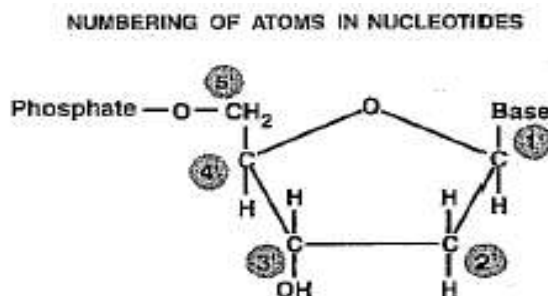
με έναν κοινό συνδετικό μηχανισμό) φτιαγμένο από μια γραμμική διευθέτηση υπομονάδων γνωστές ως νουκλεοτίδες (οι υπομονάδες από τις οποίες χτίζεται το DNA). Κάθε νουκλεοτίδα έχει τρία συστατικά: μια ομάδα φωσφορικού άλατος, μια ζάχαρη και μία αζωτούχα βάση (αλκαλική χημική ουσία, ειδικότερα οι κυκλικές ενώσεις του αζώτου που βρίσκονται στο DNA και στο RNA).

Στο DNA, η ζάχαρη είναι πάντα δεοξυριβόζη. Οι διαφορετικοί τύποι νουκλεοτιδίων διαφέρουν μόνο στη φύση αζωτούχας βάσης. Στο DNA υπάρχουν τέσσερις εναλλακτικές βάσεις: η αδερίνη, η θυμίνη, η γουανίνη και η κυτοσίνη. Όταν καταγράφονται γενετικές πληροφορίες αυτές οι βάσεις είναι συντομευμένες με σύμβαση σε: A, T, G και C. Οι ομάδες φωσφορικού άλατος και οι ζάχαρες δεοξυριβόζης διαμορφώνουν τη σπονδυλική στήλη κάθε αλυσίδας του DNA. Οι βάσεις ενώνονται στη δεοξυριβόζη και προεξέχουν από τη μια μεριά. Μία ενιαία αλυσίδα DNA παρουσιάζεται στο επόμενο σχέδιο.



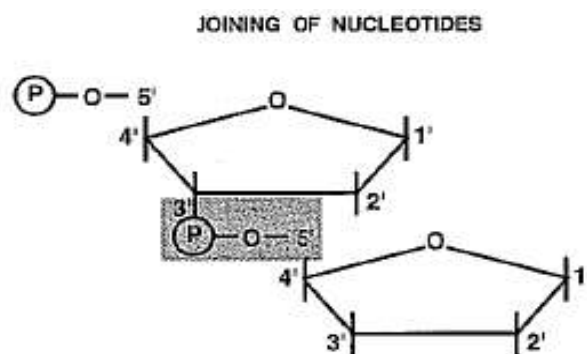
Σχήμα 2.2 Μία ενιαία αλυσίδα DNA, από [4]

Για να καταλάβουμε πώς ενώνονται οι νουκλεοτίδες, πρέπει να διευκρινίσουμε την κατάσταση με την αρίθμηση των ατόμων άνθρακα του μορίου ζάχαρης. Το επόμενο σχέδιο παρουσιάζει τη σύμβαση για την αρίθμηση των νουκλεοτίδων.



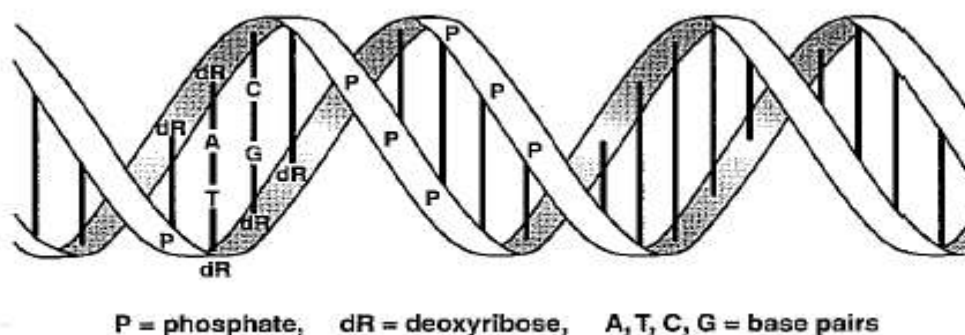
Σχήμα 2.3 Αρίθμηση των ατόμων μιας νουκλεοτίδας, από [4]

Οι νουκλεοτίδες ενώνονται με τη σύνδεση του φωσφορικού άλατος στο 5' άκρο της μιας δεοξυριβόζης και στο 3' άκρο της επόμενης, όπως παρουσιάζεται.



Σχήμα 2.4 Σύνδεση νουκλεοτιδίων, από [4]

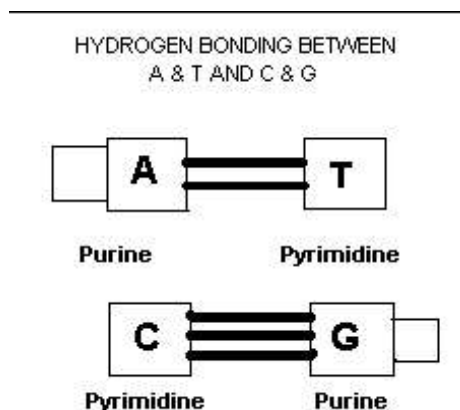
Πρακτικά, το DNA είναι ένα δίκλωνο μόριο. Όχι μόνο το DNA είναι δίκλωνο μόριο, αλλά οι δύο χωριστές αλυσίδες τυλίγονται η μία γύρω από την άλλη σε μια ελικοειδή ρύθμιση. Αυτό είναι γνωστό ως διπλός έλικας.



Σχήμα 2.5 Διπλός έλικας, από [4]

Στο δίκλωνο DNA, οι βάσεις της μιας αλυσίδας είναι ζευγαρωμένες με τις βάσεις της άλλης αλυσίδας. Η αδενίνη (A) στη μια αλυσίδα είναι πάντα ζευγαρωμένη με τη θυμίνη (T) στην άλλη και η γουανίνη (G) είναι πάντα ζευγαρωμένη με την κυτοσίνη (C). Οι βάσεις A και G αναφέρονται ως πουρινικές βάσεις δεδομένου ότι περιέχουν μια δομή διπλού δακτυλίου γνωστός ως πουρινικός δακτύλιος. Οι άλλες δύο βάσεις, C και T, είναι οι πυριμιδινικές βάσεις, δεδομένου ότι περιέχουν ένα ενιαίο, πυριμιδινικό δακτύλιο. Κάθε ζευγάρι βάσης

αποτελείται από μια διπλού μεγέθους πουρινική βάση που ζευγαρώνεται με μια μικρότερη πυριμιδινική βάση. Έτσι, αν και οι βάσεις διαφέρουν μεταξύ τους στο μέγεθος, όλα τα ζευγάρια βάσεων έχουν το ίδιο πλάτος. Αυτό είναι απαραίτητο για να τους επιτρέψει να ‘χωρέσουν’ στον διπλό έλικα.

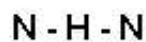


Σχήμα 2.6 Δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα ζευγάρια βάσεων, από [4]

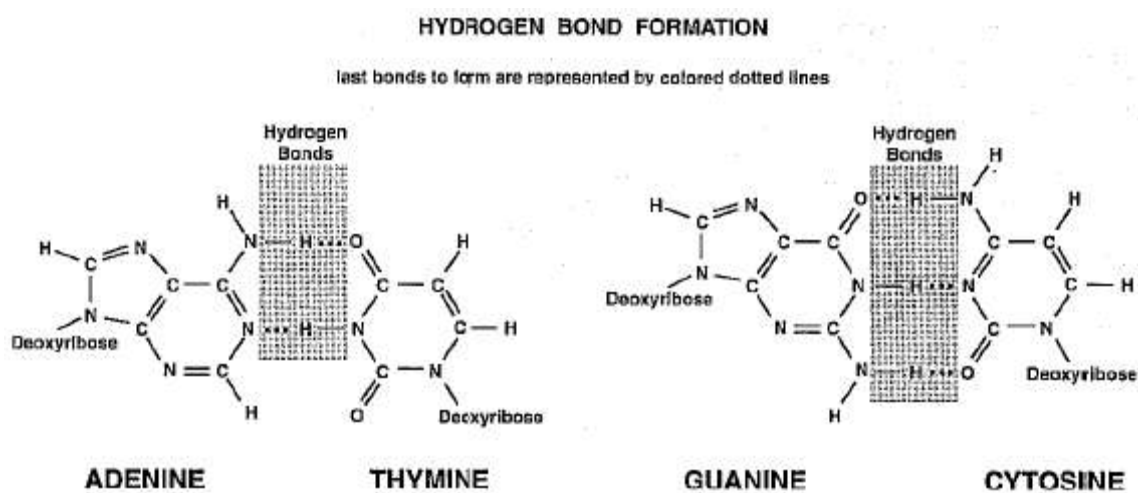
Στο δίκλωνο DNA κάθε ζευγάρι βάσεων διατηρεί τη συνοχή με συνδέσμους γνωστοί ως δεσμοί υδρογόνου. Το ζευγάρι βάσεων A - T έχει δύο δεσμούς υδρογόνου και το ζευγάρι βάσεων G - C έχει τρεις. Οι δεσμοί υδρογόνου είναι πολύ αδύναμοι, αλλά δεδομένου ότι ένα μόριο του DNA περιέχει συνήθως εκατομμύρια ζευγάρια βάσεων, η προστιθέμενη επίδραση εκατομμυρίων αδύναμων δεσμών είναι αρκετά ισχυρή να κρατήσει τις δύο αλυσίδες ενωμένες. Η σύνδεση υδρογόνου στα ζευγάρια βάσεων του DNA χρησιμοποιεί είτε οξυγόνο (O) είτε άζωτο (N), που δίνει τρεις εναλλακτικές ρυθμίσεις. Σε κάθε περίπτωση το υδρογόνο (H) κρατιέται μεταξύ των άλλων δύο ατόμων και χρησιμεύει στο να τα συνδέει μεταξύ τους.

Πριν δημιουργηθούν οι δεσμοί υδρογόνου και τα ζευγάρια βάσεων απομακρυνθούν, το άτομο υδρογόνου βρίσκεται συνδεδεμένο με μία ή την άλλη των δύο βάσεων, όπως παρουσιάζεται με τις πλήρεις γραμμές στο σχέδιο κατωτέρω. Κατά τη διάρκεια της ένωσης βάσεων, το υδρογόνο δεσμεύεται σε ένα άτομο της δεύτερης βάσης (διακεκομμένες γραμμές)

THREE POSSIBLE TYPES
OF HYDROGEN BONDS



Σχήμα 2.7 Πιθανοί τύποι δεσμών υδρογόνου, από [4]



Σχήμα 2.8 Δημιουργία δεσμών υδρογόνου, από [4]

2.2 ΑΝΤΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ DNA

Δεδομένου ότι κάθε κύτταρο χρειάζεται ένα πλήρες σύνολο γονιδίων, είναι απαραίτητο για αρχικό κύτταρο να αναπαραγάγει τα γονίδιά του πριν διαιρεθεί. Επειδή τα γονίδια είναι

φτιαγμένα από DNA και σχηματίζουν τα χρωμοσώματα, αυτό σημαίνει ότι κάθε ένα χρωμόσωμα πρέπει να αντιγραφεί ακριβώς. Πάνω στην κυτταροδιαίρεση, και τα δύο θυγατρικά κύτταρα θα λάβουν τα ίδια σύνολα χρωμοσωμάτων, κάθε ένα με ένα πλήρες σύνολο γονιδίων.

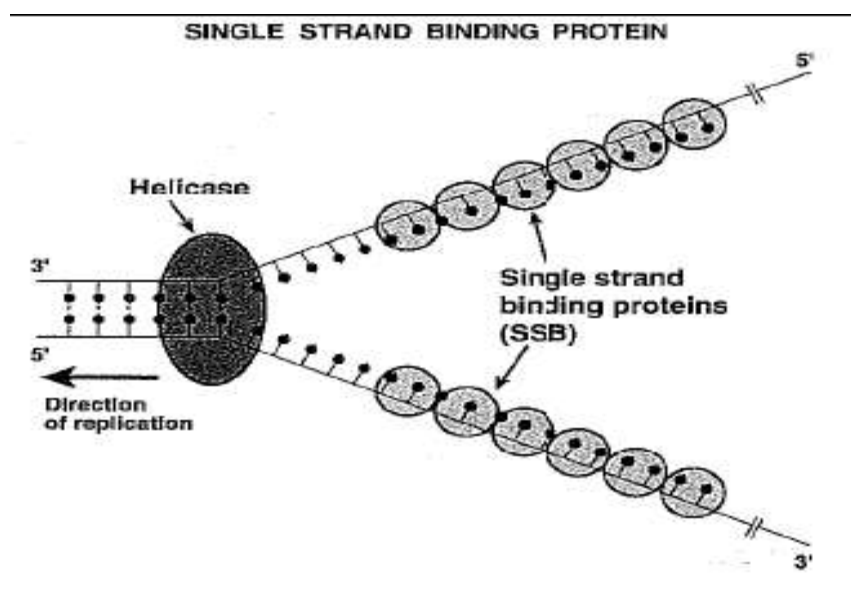
Σε μοριακούς όρους αυτό σημαίνει ότι το DNA του αρχικού, ή του μητρικού, κυττάρου αναπαράγεται για να δώσει δύο ίδια αντίγραφα. Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως αντιγραφή. Πάνω στην κυτταροδιαίρεση κάθε ένας από τους απογόνους παίρνει ένα ολόκληρο αντίγραφο του DNA. Τα αρχικά γονίδια του μητρικού κυττάρου είναι σε ένα δίκλωνο μόριο DNA έτσι το πρώτο βήμα στην αντιγραφή είναι να χωριστούν οι δύο αλυσίδες του διπλού έλικα του DNA.

Το επόμενο βήμα είναι να δημιουργηθεί μία συμπληρωματική αλυσίδα σε κάθε μία από τις δύο αρχικές αλυσίδες. Αφού η A ζευγαρώνει μόνο με την T, και η G ζευγαρώνει μόνο με την C, η αλληλουχία κάθε αλυσίδας υπαγορεύει την αλληλουχία της συμπληρωματικής αλυσίδα. Τώρα έχουμε δύο δίκλωνα μόρια DNA, και τα δύο με αλληλουχίες ίδιες με την αρχική. Ένα από αυτά τα θυγατρικά μόρια έχει την αρχική αριστερή αλυσίδα και το άλλο θυγατρικό έχει την αρχική δεξιά αλυσίδα. Αυτός ο τρόπος αυτοδιπλασιασμού είναι γνωστός ως ημισυντηρητική αντιγραφή αφού κάθε ένας από τους απογόνους διατηρεί το μισό από το αρχικό μόριο DNA.

Επειδή οι δύο αλυσίδες που διαμορφώνουν ένα μόριο DNA διατηρούνται τη συνοχή τους με δεσμούς υδρογόνου και τυλίγονται η μία γύρω από την άλλη για να διαμορφώσουν έναν διπλό έλικα, δεν μπορούν απλά να χωριστούν. Ακόμα χειρότερα, το DNA μέσα σε ένα κύτταρο είναι επίσης υπερελικωμένο για να χωρέσει μέσα σε ένα μικρό διάστημα. Πριν χωριστούν οι αλυσίδες, και οι υπερέλικες και ο διπλός έλικας πρέπει να ξετυλιχτούν.

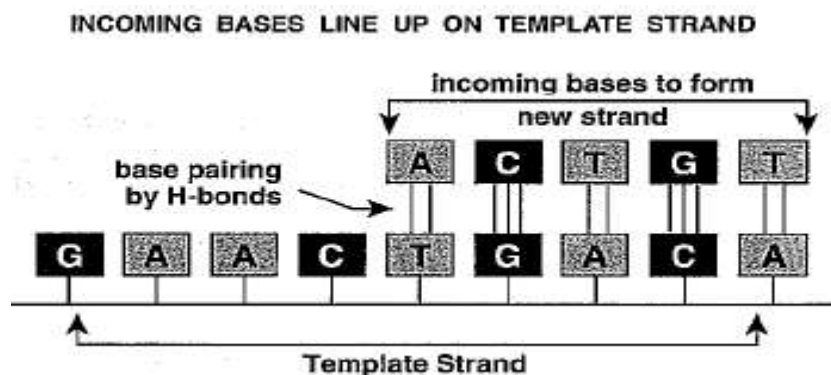
Αυτό γίνεται σε δύο στάδια. Πρώτα οι υπερέλικες ξετυλίγονται από ένα ένζυμο γνωστό ως DNA γυράση. Η γυράση κόβει και τις δύο αλυσίδες του δίκλωνου DNA για να δώσει ένα δίκλωνο σπάσιμο. Εντούτοις, κρατά όλες τις άκρες που έχουν κοπεί. Τα δύο μισά της γυράσης τότε περιστρέφονται σχετικά μεταξύ τους και άκρες επανασυνδέονται. Αυτό ξετυλίγει τους υπερέλικες. Κάθε περιστροφή κοστίζει στο κύτταρο ένα μικρό ποσό ενέργειας. Μόλις οι υπερέλικες ξεδιπλωθούν, ο διπλός έλικας ξετυλίγεται από το ένζυμο DNA ελικάση. Η ελικάση δεν σπάει τις αλυσίδες DNA απλά διασπάει τους δεσμούς υδρογόνου που κρατούν ενωμένα τα ζευγάρια βάσεων.

Οι δύο χωρισμένες αλυσίδες του γονικού μορίου DNA είναι συμπληρωματικές η μία της άλλης. Συνεπώς όλες οι αντίστοιχες βάσεις τους είναι ικανές να χωρίζουν και να ενώνονται μεταξύ τους. Προκειμένου να κατασκευαστούν οι νέες αλυσίδες, οι δύο αρχικές αλυσίδες, παρά την επιθυμία τους να προσκολληθούν μαζί, πρέπει κάπως να κρατηθούν χωριστά. Αυτό γίνεται με τη βοήθεια μιας ειδικής "διαζευκτικής" πρωτεΐνης που δεσμεύει το αζευγάρωτο μονόκλωνο DNA και αποτρέπει τις δύο γονικές αλυσίδες από το να ενωθούν ξανά μεταξύ τους. Αυτή είναι γνωστή ως single strand protein ή πρωτεΐνη SSB.



Σχήμα 2.9 Λειτουργία της πρωτεΐνης SSB, από [4]

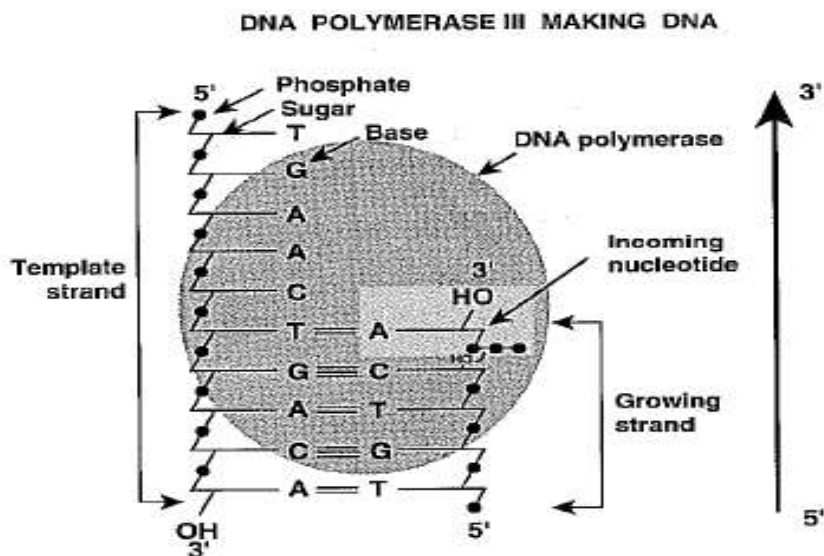
Το κρίσιμο ζήτημα στην αντιγραφή είναι το ζευγάρωμα των βάσεων του A με το T και του G με C. Κάθε μία από τις χωρισμένες γονικές αλυσίδες του DNA χρησιμεύει ως ένα καλούπι για τη σύνθεση μιας νέας συμπληρωματικής αλυσίδας. Οι εισερχόμενες νουκλεοτίδες για τη νέα αλυσίδα αναγνωρίζουν τους συνεργάτες τους με το ζευγάρωμα βάσεων και έτσι παρατάσσονται στην αλυσίδα καλούπι.



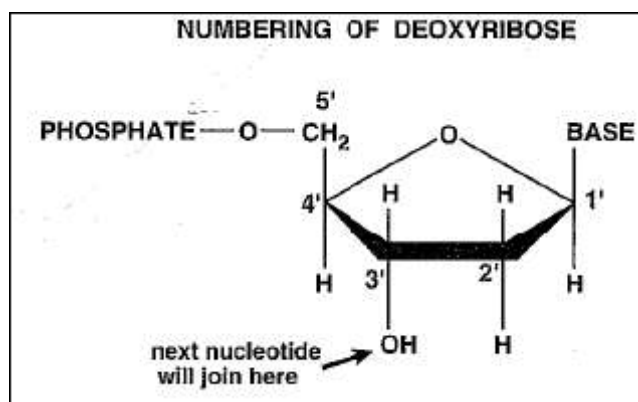
Σχήμα 2.10 Ζευγάρωμα των βάσεων, από [4]

Στην πραγματικότητα, τα πράγματα είναι λίγο πιο περίπλοκα. Αν και οι δεσμοί υδρογόνου από μόνοι τους θα ταίριαζαν με τις βάσεις σωστά κατά 99 τοις εκατό, αυτό δεν είναι αρκετά καλό. Το ένζυμο που συνδέει τις νουκλεοτίδες, γνωστό ως DNA πολυμεράση III ή POL III μπορεί επίσης να αισθανθεί εάν οι βάσεις είναι σωστά ζευγαρωμένες. Αν όχι, το κακώς συνδυασμένο ζευγάρι βάσεων απορρίπτεται. Οι νουκλεοτίδες ενώνονται έπειτα μαζί από το ένζυμο. Αυτή η DNA πολυμεράση έχει δύο υπομονάδες. Μία από αυτές είναι η συνθετική υπομονάδα και είναι αρμόδια για την κατασκευή του νέου DNA. Η άλλη υπομονάδα διαμορφώνεται σαν ένα ντόνατ και γλιστρά πάνω-κάτω σαν ένα δαχτυλίδι κουρτινών στην αλυσίδα καλούπι του DNA. Αυτή η υπομονάδα δεσμεύει τη συνθετική υπομονάδα στο DNA.

Για τη σύνθεση, οι νουκλεοτίδες, καθώς έχουμε ήδη πει, έχουν τρία συστατικά: μία ομάδα φωσφορικού άλατος, μια ζάχαρη και τη βάση. Στο DNA η ζάχαρη είναι δεοξυριβόζη, και ενώνεται με τη βάση στη θέση 1' και με την ομάδα φωσφορικού άλατος στη θέση 5'. Τα άτομα άνθρακα της ζάχαρης δεοξυριβόζης είναι αριθμημένα με τα πρωταρχικά σημάδια για να τα διακρίνουμε από εκείνα της βάσης που έχουν καθαρούς αριθμούς. Όταν μια νέα νουκλεοτίδα προστίθεται, ενώνεται μέσω της ομάδας φωσφορικού άλατός της στη θέση 5' με τη θέση 3' όπως υποδεικνύεται από το βέλος. Οι νέες αλυσίδες DNA αρχίζουν πάντα από το άκρο 5' και αναπτύσσονται με κατεύθυνση στο 3'.

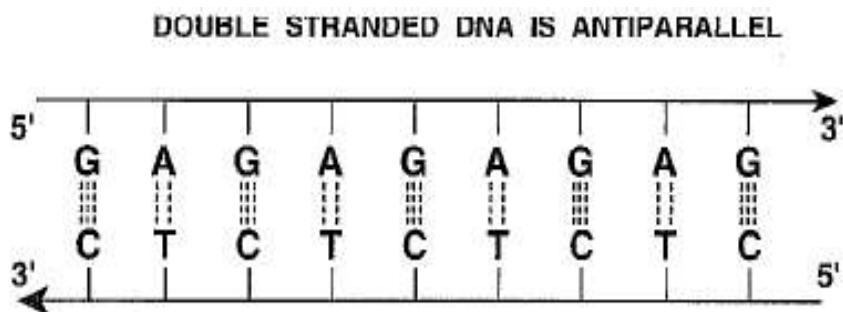


Σχήμα 2.11 Λειτουργία της DNA πολυμεράσης III, από [4]



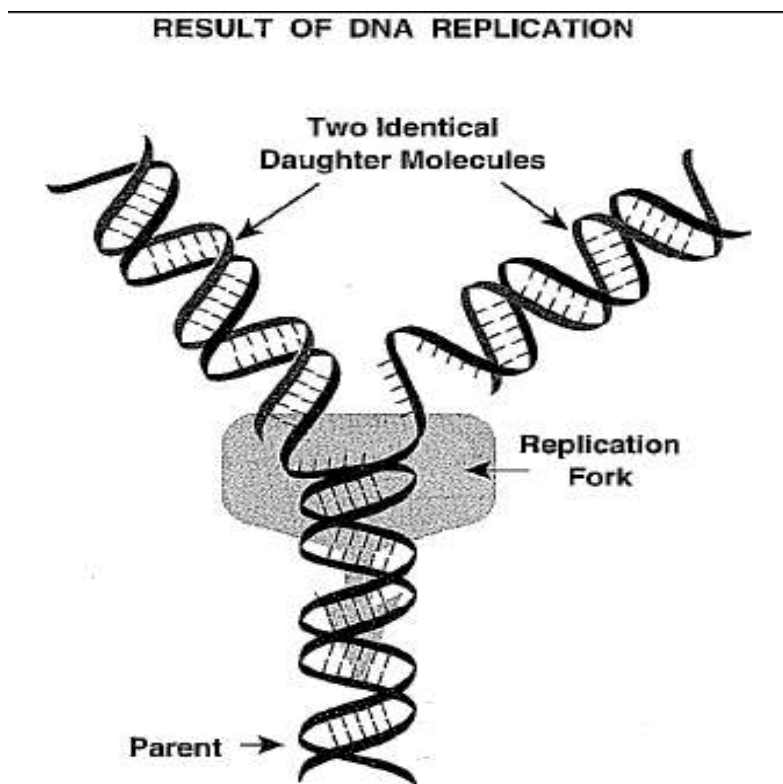
Σχήμα 2.12 Η αρίθμηση των ατόμων άνθρακα της δεοξυριβόζης, από [4]

Στην πραγματικότητα, όλα τα νουκλεϊνικά οξέα, είτε το DNA είτε το RNA, γίνονται πάντα με την κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$. Εντούτοις, το DNA είναι κανονικά δίκλωνο, και συμβαίνει οι δύο αλυσίδες να εκτείνονται σε αντίθετες κατευθύνσεις δηλαδή εάν η μία πηγαίνει $5' \rightarrow 3'$ τότε η συμπληρωματική της θα πηγαίνει $3' \rightarrow 5'$. Οι αλυσίδες λέγονται αντιπαράλληλες.



Σχήμα 2.13 Η κατεύθυνση των αλυσίδων του DNA, από [4]

Δεδομένου ότι το DNA γίνεται πάντα στην κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$, και οι δύο αλυσίδες του διπλού ελικοειδούς DNA είναι αντιπαράλληλες, αυτό σημαίνει ότι κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA οι δύο νέες αλυσίδες πρέπει να συντεθούν σε αντίθετες κατευθύνσεις. Λόγω αυτού, η μία αλυσίδα συντίθεται συνεχώς και αναφέρεται ως 'οδηγός' κλώνος και η άλλη αλυσίδα συντίθεται κομματιαστά και είναι γνωστή ως 'συνοδός' κλώνος. Όπως οι δύο νέες αλυσίδες του DNA συντίθενται, δύο διπλά ελικοειδή μόρια DNA παράγονται, κάθε ένα με μία παλιά και μία νέα αλυσίδα. Μόλις η διγάλα αντιγραφής κλείσει, το δίκλωνο μόριο DNA ξανατυλίγει αυτόματα σε έναν έλικα.



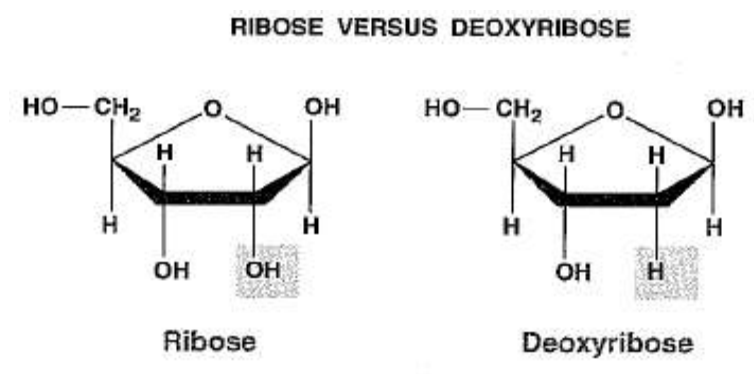
Σχήμα 2.14 Η διαδικασία αντιγραφής του DNA, από [4]

2.3 Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑΣ

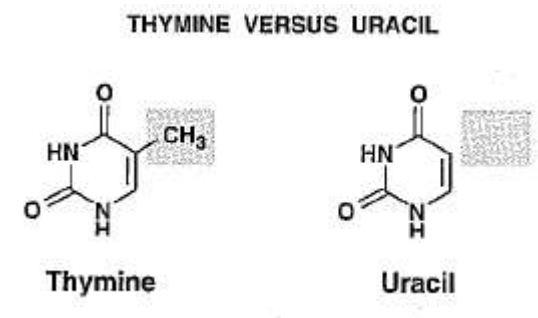
Κατά τη διάρκεια της καθημερινής ζωής ενός κυττάρου, χρησιμοποιούνται αντίγραφα εργασίας των γονιδίων. Το μόριο DNA που φέρει το αρχικό αντίγραφο των γενετικών πληροφοριών είναι θεωρημένος σαν ιερό και δεν χρησιμοποιείται ως άμεση πηγή οδηγιών που διευθύνουν το κύτταρο. Οι γενετικές πληροφορίες μπορούν να μεταφερθούν από δύο είδη μορίων νουκλεϊνικού οξέος, το DNA ή το RNA. Τα αντίγραφα εργασίας των γονιδίων αποτελούνται από RNA, ή ριβονουκλεϊκό οξύ, το οποίο είναι πολύ παρόμοιο στη χημική δομή με το DNA. Ο συγκεκριμένος τύπος μορίου RNA που μεταφέρει τις γενετικές πληροφορίες από τα γονίδια στο υπόλοιπο του κυττάρου είναι γνωστός ως αγγελιοφόρο RNA, συνήθως συντομευμένος σε mRNA. Η μεταφορά των πληροφοριών από το DNA στο αγγελιοφόρο RNA είναι γνωστή ως μεταγραφή.

Για να μεταγραφεί ένα γονίδιο, το DNA, που είναι δίκλωνο, πρέπει πρώτα διαχωριστεί προσωρινά. Κατόπιν γίνεται ένα μόριο μονόκλωνου RNA. Αυτό είναι το αγγελιοφόρο RNA και έχει μια αλληλουχία βάσεων που είναι συμπληρωματική με αυτή της αλυσίδας DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα.

Υπάρχουν δύο σχετικά είδη νουκλεϊνικού οξέος (DNA) και ριβονουκλεϊνικού οξέος (RNA). Η πρώτη διαφορά μεταξύ τους είναι ότι στο DNA η ζάχαρη είναι πάντα δεοξυριβόζη, ενώ στο RNA η ζάχαρη είναι ριβόζη, όπως παρουσιάζεται σχέδιο κατωτέρω.



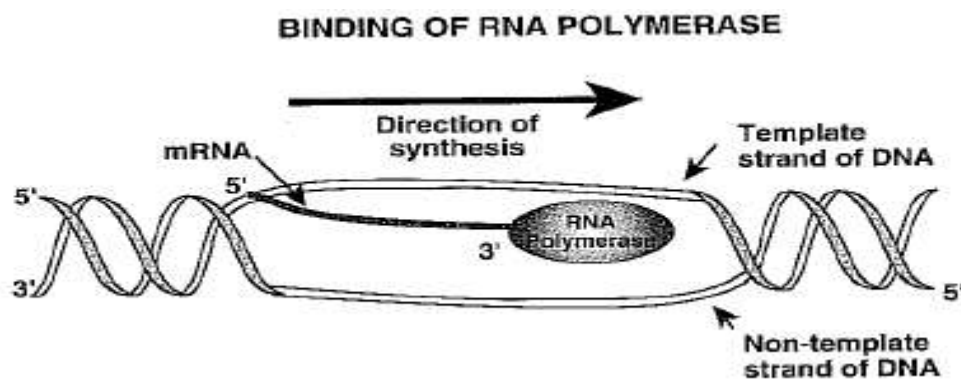
Σχήμα 2.15 Διαφορά ριβόζης και δεοξυριβόζης, από [4]



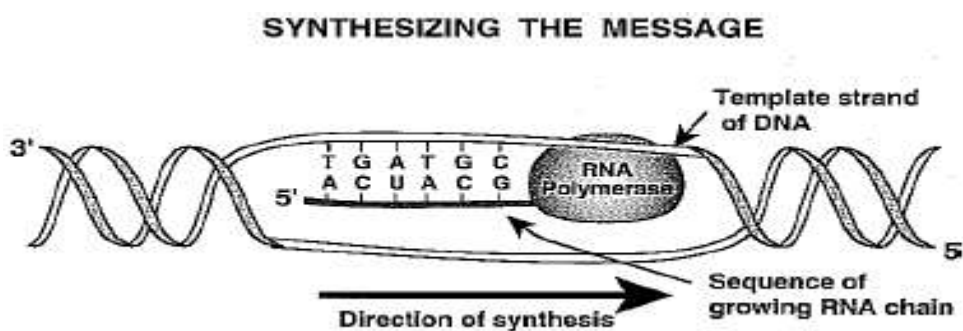
Σχήμα 2.16 Διαφορά θυμίνης και ουρακίλης, από [4]

Όπως προτείνει το όνομά του, η δεοξυριβόζη έχει ένα άτομο οξυγόνου λιγότερο από τη ριβόζη. Είναι αυτή η αρχική διαφορά που δίνει το D στο DNA εναντίον του R στο RNA! Η δεύτερη διαφορά είναι ότι στο RNA, η βάση θυμίνη (T) είναι αντικατεστημένη από την βάση ουρακίλη (U) (επόμενο σχέδιο). Οπουδήποτε βρίσκετε τη θυμίνη στο DNA, παίρνετε ουρακίλη στο RNA. Ως εκ τούτου, η ουρακίλη στο RNA και η θυμίνη στο DNA μεταβιβάζουν οι ίδιες γενετικές πληροφορίες. Έτσι, εάν περιλαμβάνουμε το RNA με το DNA, το γενετικό αλφάβητο έχει πέντε γράμματα (A, C, G, T και U). Η τρίτη και τελική διαφορά μεταξύ του DNA και RNA είναι ότι το DNA είναι δίκλωνο (ds), ενώ το RNA είναι συνήθως μονόκλωνο (ss). Κατά συνέπεια, όταν ένα γονίδιο φτιαγμένο από dsDNA μεταγράφεται σε ένα μήνυμα RNA, μόνο μία εκ των αλυσίδων του DNA αντιγράφεται. Η αλληλουχία του μηνύματος RNA είναι συμπληρωματική της μητρικής αλυσίδας του DNA επάνω στην οποία είναι συντεθειμένη. Εκτός από την αντικατάσταση της θυμίνης του DNA με την ουρακίλη του RNA, αυτό σημαίνει ότι η αλληλουχία του νέου μορίου RNA είναι ίδια με την αλληλουχία της κωδικοποιημένης αλυσίδας του DNA, αυτής που δεν χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της μεταγραφής.

Το RNA γίνεται από ένα ένζυμο αποκαλούμενο RNA πολυμεράση. Αυτό το ένζυμο προσδένεται στο DNA στην αρχή ενός γονιδίου και ανοίγει το διπλό έλικα. Έπειτα συνεχίζει για να κατασκευάσει ένα μήνυμα RNA. Η περιοχή όπου η RNA πολυμεράση προσδένεται είναι γνωστή ως υποκινητής (promoter). Μόλις η σίγμα βρει έναν υποκινητή και η RNA πολυμεράση έχει δεσμευτεί επιτυχώς σε αυτόν, η υπομονάδα σίγμα απομακρύνεται. Το υπόλοιπο μέρος από τη βακτηριακή RNA πολυμεράση, γνωστή σαν πυρήνας του ενζύμου (core enzyme), κατόπιν κάνει το mRNA. Ο διπλός έλικας του DNA ανοίγεται και μία αλυσίδα RNA παράγεται χρησιμοποιώντας μία από τις αλυσίδες του DNA ως καλούπι για να ταιριάζει με τις βάσεις.



Σχήμα 2.17 Πρόσδεση της RNA πολυμεράσης, από [4]



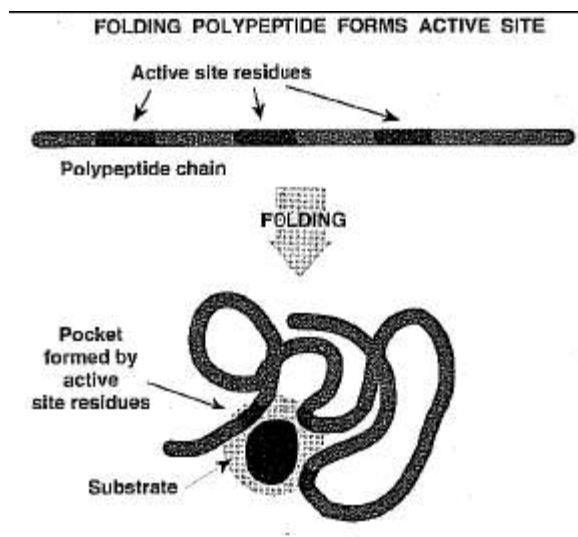
Σχήμα 2.18 Σύνθεση μίας αλυσίδας RNA, από [4]

Οι πρωτεΐνες παίζουν έναν σημαντικό ρόλο στη σύνθεση του αγγελιοφόρου RNA. Υπάρχουν πρωτεΐνες ενεργοποιητές που βοηθούν τα γονίδια να ενεργοποιηθούν, αλλά υπάρχουν επίσης και πρωτεΐνες που μπορούν να απενεργοποιήσουν τα γονίδια. Ιστορικά, αυτοί οι αρνητικοί ρυθμιστές στην πραγματικότητα ανακαλύφθηκαν πρώτοι, είναι γνωστοί ως καταστολείς (repressors) και λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο με τους ενεργοποιητές εκτός του ότι έχουν την αντίθετη επίδραση.

2.4 ΟΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΚΥΤΤΑΡΟ

Οι πρωτεΐνες είναι βιολογικά πολυμερή που πραγματοποιούν το μεγαλύτερο μέρος των καθημερινών λειτουργιών του κυττάρου. Μερικές πρωτεΐνες είναι μόνο δομικές ή συμμετέχουν στη μετακίνηση του κυττάρου, άλλες βοηθούν να λάβει τις θρεπτικές ουσίες, άλλες παράγουν ενέργεια και άλλες πραγματοποιούν τις βιοχημικές αντιδράσεις, συμπεριλαμβανομένης της σύνθεσης των νουκλεοτιδών και της συναρμολόγησής τους στα νουκλεϊνικά οξέα.

Τα μόρια, των οποίων ο αρχικός ρόλος είναι να μεταφέρουν πληροφορίες (νουκλεϊνικά οξέα όπως το DNA και το αγγελιοφόρο RNA) είναι βασικά γραμμικά μόρια με μία κανονική επαναλαμβανόμενη δομή. Μόρια που διαμορφώνουν κυτταρικές δομές ή έχουν ενεργούς ρόλους στην πραγματοποίηση αντιδράσεων είναι κανονικά διπλωμένα σε τρισδιάστατες (3-D) δομές. Αυτές περιλαμβάνουν και τις πρωτεΐνες και ορισμένα εξειδικευμένα μόρια RNA (rRNA και tRNA).



Σχήμα 2.19 Δομή μιας πρωτεΐνης, από [4]

Οι πρωτεΐνες γίνονται από μια γραμμική αλυσίδα μονομερών, γνωστή ως αμινοξέα, και είναι διπλωμένα σε ποικίλες σύνθετες τρισδιάστατες μορφές. Μια αλυσίδα από αμινοξέα καλείται πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η διαφορά μεταξύ μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας και μιας πρωτεΐνης είναι ότι μερικές πρωτεΐνες αποτελούνται από περισσότερες από μία πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Μπορούμε να υποδιαιρέσουμε τις πρωτεΐνες σε τέσσερις κύριες κατηγορίες:

- 1) δομικές πρωτεΐνες,
- 2) ένζυμα,
- 3) ρυθμιστικές πρωτεΐνες,
- 4) πρωτεΐνες μεταφορών.

Οι δομικές πρωτεΐνες φτιάχνουν πολλές υποκυτταρικές δομές. Τα μαστίγια με τα οποία κολυμπούν τα βακτηρίδια, οι μικροσωλινίσκοι πρωτοπλάσματος που χρησιμοποιούνται στον έλεγχο της κυκλοφοριακής ροής μέσα στα κύτταρα των υψηλότερων οργανισμών, οι ίνες μέσα σε ένα μυϊκό κύτταρο, και το εξωτερικό περίβλημα των ιών είναι μερικά παραδείγματα των δομών που κατασκευάζονται με τη χρησιμοποίηση των πρωτεϊνών.

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που πραγματοποιούν χημικές αντιδράσεις. Ένα ένζυμο πρώτα δεσμεύει ένα άλλο μόριο, γνωστό ως το υπόστρωμά του, και εκτελεί έπειτα μερικές χημικές διαδικασίες με αυτό. Μερικά ένζυμα δεσμεύουν μόνο ένα μόριο υπόστρωμα, άλλα μπορούν να δεσμεύσουν δύο ή περισσότερα, και να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους για να κάνουν το τελικό προϊόν. Εν πάση περιπτώσει, το ένζυμο χρειάζεται μια ενεργό περιοχή, μια τσέπη ή σχισμή στην πρωτεΐνη, όπου δεσμεύεται το υπόστρωμα και πραγματοποιείται η αντίδραση. Η ενεργός περιοχή παράγεται με το σωστό δίπλωμα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας έτσι ώστε υπολείμματα αμινοξέων που εξαπλώθηκαν σε μεγάλες αποστάσεις στη γραμμική αλυσίδα τώρα θα ενωθούν και θα συνεργαστούν στην ενζυμική αντίδραση.

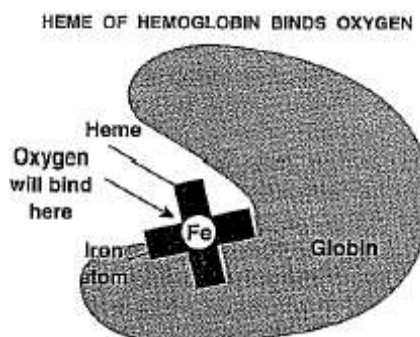
Το διασημότερο ένζυμο μέσα η μοριακή βιολογία είναι β-γαλακτοσιδάση, που κωδικοποιείται με το γονίδιο *lacZ* του βακτηριδίου *Escherichia coli*. Αυτό το ένζυμο είναι τόσο εύκολο στη χρήση που χρησιμοποιείται ευρέως στη γενετική ανάλυση. Το φυσικό υπόστρωμα της β-γαλακτοσιδάσης είναι η ζάχαρη λακτόζη, που γίνεται από τη σύνθεση γλυκόζης και γαλακτόζης. Δεν υπάρχουν και πολλά να κάνεις με τη λακτόζη εκτός από το να τη διασπάσεις σε αυτές τις δύο απλούστερες ζάχαρες, έτσι αυτό είναι ακριβώς που κάνει η β-γαλακτοσιδάση.

Τα ανάλογα είναι μόρια που μοιάζουν με τις φυσικές ουσίες αρκετά καλά έτσι ώστε να ξεγελάσουν τα ένζυμα που τα χρησιμοποιούν. Μερικά ανάλογα δεσμεύονται αλλά δεν αντιδρούν και απλά μπλοκάρουν την ενεργό περιοχή και εμποδίζουν το ένζυμο. Τέτοια ανάλογα είναι γνωστά ως συναγωνιστικοί αναστολείς (competitive inhibitors) δεδομένου ότι συμπληρώνονται με το αληθινό υπόστρωμα για την προσοχή του ενζύμου. Άλλα ανάλογα αντιδρούν. Η β-γαλακτοσιδάση χωρίζει πολλά μόρια στα οποία η γαλακτόζη συνδέεται με κάτι άλλο. Αυτό μπορούμε να το εκμεταλλευτούμε με το να του δώσουμε ONPG (ortho-nitro-phenyl-galactoside), το οποίο αποτελείται από ορθο - νιτροφαινόλη που συνδέεται με τη γαλακτόζη. Όταν το ONPG διασπάται, παίρνουμε γαλακτόζη, που είναι άχρωμη, και ορθο - νιτροφαινόλη, η οποία έχει χρώμα φωτεινό κίτρινο. Η χρησιμοποίηση ONPG μας επιτρέπει για να ελέγχουμε το επίπεδο της β-γαλακτοσιδάσης με τη μέτρηση της εμφάνισης του κίτρινου χρώματος. Ομοίως, η X-gal διασπάται με τη β-γαλακτοσιδάση σε μια μπλε χρωστική ουσία και σε γαλακτόζη.

Αν και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες μεταφορών δεν είναι ένζυμα, δεσμεύουν και αυτές άλλα μόρια και έτσι και αυτές χρειάζονται τις "ενεργές περιοχές" για να προσαρμοστούν.

Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ποικίλλουν πάρα πολύ. Πολλές από αυτές μπορούν να δεσμεύσουν και μικρά μόρια σημάτων και DNA. Η παρουσία ή η απουσία του μορίου σημάτων καθορίζει εάν το γονίδιο λειτουργεί ή όχι.

Οι πρωτεΐνες μεταφορών βρίσκονται συνήθως στις βιολογικές μεμβράνες όπου μεταφέρουν το υλικό από τη μια πλευρά στην άλλη. Οι θρεπτικές ουσίες, όπως οι ζάχαρες, πρέπει να μεταφέρονται στα κύτταρα όλων των οργανισμών, ενώ τα απόβλητα πρέπει να αποπέμπονται. Οι πολυκυτταρικοί οργανισμοί έχουν επίσης πρωτεΐνες μεταφορών για να μεταφέρουν τα υλικά γύρω από το σώμα. Ένα παράδειγμα είναι αιμογλοβίνη, η οποία μεταφέρει το οξυγόνο στο αίμα.



Σχήμα 2.20 Η πρωτεΐνη αιμογλοβίνη, από [4]

Για να λειτουργήσουν κατάλληλα πολλές πρωτεΐνες χρειάζονται πρόσθετα συστατικά, συνένζυμα ή προσθετικές ομάδες, τα οποία δεν είναι τα ίδια πρωτεΐνες. Πολλές πρωτεΐνες χρησιμοποιούν ενιαία άτομα μετάλλων ως συνένζυμα, άλλες χρειάζονται πιο σύνθετα μόρια. Για να κυριολεκτήσουμε, οι προσθετικές ομάδες καθορίζονται σε μια πρωτεΐνη, ενώ τα συνένζυμα είναι ελεύθερα να περιπλανηθούν από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη, εντούτοις, οι όροι χρησιμοποιούνται συχνά αόριστα. Μια πρωτεΐνη χωρίς την προσθετική της ομάδα αναφέρεται ως αποπρωτεΐνη. Για παράδειγμα, πρωτεΐνες μεταφορέων οξυγόνου όπως η αιμογλοβίνη έχουν ένα σταυροειδές συνένζυμο με ένα κεντρικό άτομο σιδήρου, που λέγεται αίμη. Η αίμη είναι συνδεδεμένη στην ενεργό περιοχή της αποπρωτεΐνης, σε αυτήν την περίπτωση γλοβίνη, και έτσι εμείς παίρνουμε την αιμογλοβίνη. Το οξυγόνο δεσμεύεται στο άτομο σιδήρου στο κέντρο της αίμης και η αιμογλοβίνη το μεταφέρει γύρω από σώμα. Οι προσθετικές ομάδες μοιράζονται συχνά περισσότερες από μια πρωτεΐνες, για παράδειγμα, η αίμη μοιράζεται από την αιμογλοβίνη και από την μυογλοβίνη, η οποία λαμβάνει το οξυγόνο και το διανέμει μέσα στα κύτταρα των μυών.

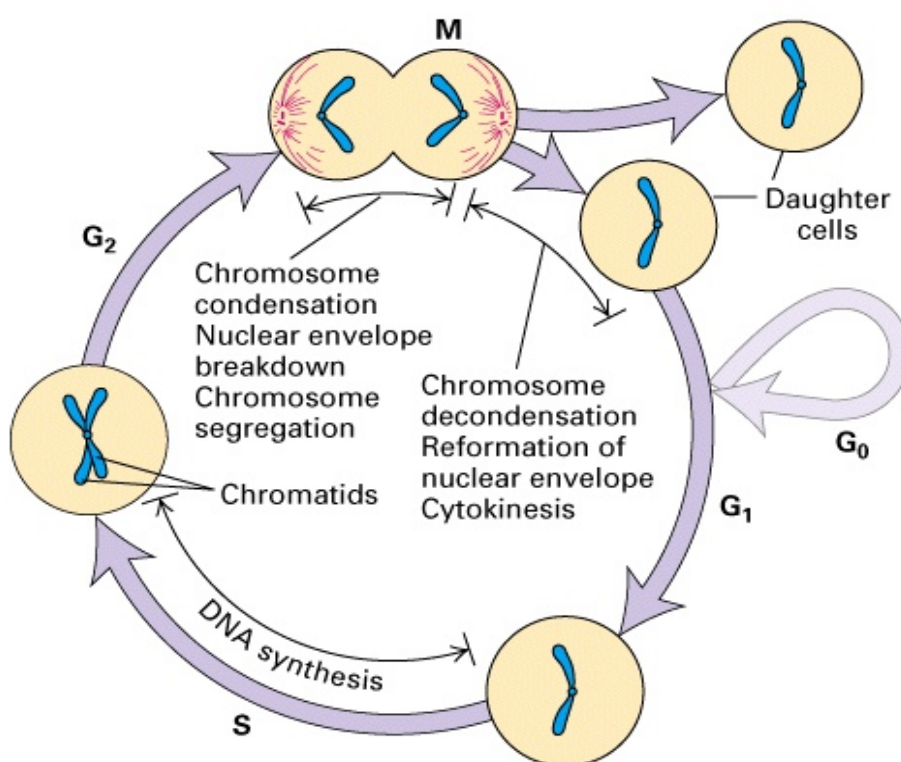
2.5 ΚΥΤΤΑΡΟΔΙΑΙΡΕΣΗ: Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο κύκλος των κυττάρων έχει τέσσερα στάδια :

1. φάση G_1 – το κύτταρο μεγαλώνει
2. φάση S – τα χρωμοσώματα αντιγράφονται
3. φάση G_2 – το κύτταρο μεγαλώνει και ετοιμάζεται να διαιρεθεί
4. φάση M – το κύτταρο και ο πυρήνας του διαιρούνται

Για να κινηθούμε από το ένα στάδιο στο άλλο χρειάζεται άδεια από πρωτεΐνες που ονομάζονται κυκλίνες (cyclins), μία για κάθε κυρίως στάδιο. Οι κυκλίνες δρουν σαν φρουροί σε ένα σημείο ελέγχου ασφάλειας. Παρακολουθούν και ελέγχουν το περιβάλλον και ελέγχουν για να σιγουρευτούν ότι το προηγούμενο στάδιο του κυτταρικού κύκλου έχει ολοκληρωθεί κατάλληλα πριν αρχίσει το επόμενο.

Οι κυκλίνες έχουν υποτελείς, τις εξαρτώμενες κυκλινικές κινάσεις (cyclin dependent kinases) ή πρωτεΐνες CDK. Όταν η κυκλίνη σε έναν συγκεκριμένο βήμα αποφασίζει να ενεργοποιηθεί, ενώνεται με την CDK πρωτεΐνη της. Αυτό ενεργοποιεί την CDK πρωτεΐνη η οποία τότε προσθέτει ομάδες φωσφορικού άλατος σε μία ολόκληρη σειρά από άλλες πρωτεΐνες των οποίων η δουλειά είναι το να κάνουν τη διάσπαση του κυττάρου. Αυτές οι πρωτεΐνες είναι στην αναμονή μέχρι να ενεργοποιηθούν από την ομάδα φωσφορικού άλατος.



Σχήμα 2.21 Τα τέσσερα στάδια του κυτταρικού κύκλου, από [12].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΩΣ ΔΥΝΑΜΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

3.1 ΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΩΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΙΣΟΔΟΥ ΕΞΟΔΟΥ [15]

Κάποιος μπορεί να δει τη ζωή κυττάρων ως συλλογή "ασύρματων δικτύων" αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεϊνών, RNA, DNA και μικρότερων μορίων που σχετίζονται με σηματοδότηση και ενεργειακή μεταφορά. Αυτά τα δίκτυα επεξεργάζονται περιβαλλοντικά σήματα, προκαλούν τις κατάλληλες κυτταρικές αντιδράσεις, και προκαλούν εσωτερικά γεγονότα όπως η γονιδιακή έκφραση, επιτρέποντας κατά συνέπεια στα κύτταρα και σε ολόκληρους τους οργανισμούς να εκτελέσουν τις βασικές λειτουργίες τους. Αυτά τα δίκτυα ελέγχου και επικοινωνίας μπορεί να είναι σχετικά απλά, όπως τα συστήματα δύο-συστατικών που βρίσκονται κυρίως στα βακτηρίδια, τα οποία είναι συνδεδεουν σειριακά τους αισθητήρες (πρωτεΐνες στη μεμβράνη κυττάρων, οι οποίες ανιχνεύουν τα εξωτερικά σήματα) με τους ενεργοποιητές (τυπικοί παράγοντες μεταγραφής, οι οποίοι κατευθύνουν την έκφραση ενός γονιδίου). Ή μπορούν να είναι απίστευτα πολύπλοκα, όπως σε ανώτερους οργανισμούς, περιλαμβάνοντας πολλαπλάσια pathways μεταγωγής σημάτων στα οποία οι πληροφορίες αναμεταδίδονται μεταξύ των ενζύμων μέσω των χημικών αντιδράσεων (παραδείγματος χάριν, φωσφοροποίηση).

Εκτός από τις ανάγκες τους για την επιβίωση και την αναπαραγωγή, τα κύτταρα στους πολυκυτταρικούς οργανισμούς χρειάζονται πρόσθετα επίπεδα πολυπλοκότητας προκειμένου να επιτραπεί η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων και του γενικού συντονισμού, καθώς επίσης και για να κατευθυνθεί η διαφοροποίηση από ένα γονιμοποιημένο αυγό στους διάφορους ιστούς σε ένα μεμονωμένο μέλος ενός είδους. Εμείς θα εστιάσουμε στα ενδοκυτταρικά pathways, αλλά αυτές οι άλλες πτυχές δεν είναι λιγότερο ενδιαφέροντες τομείς για μελέτη.

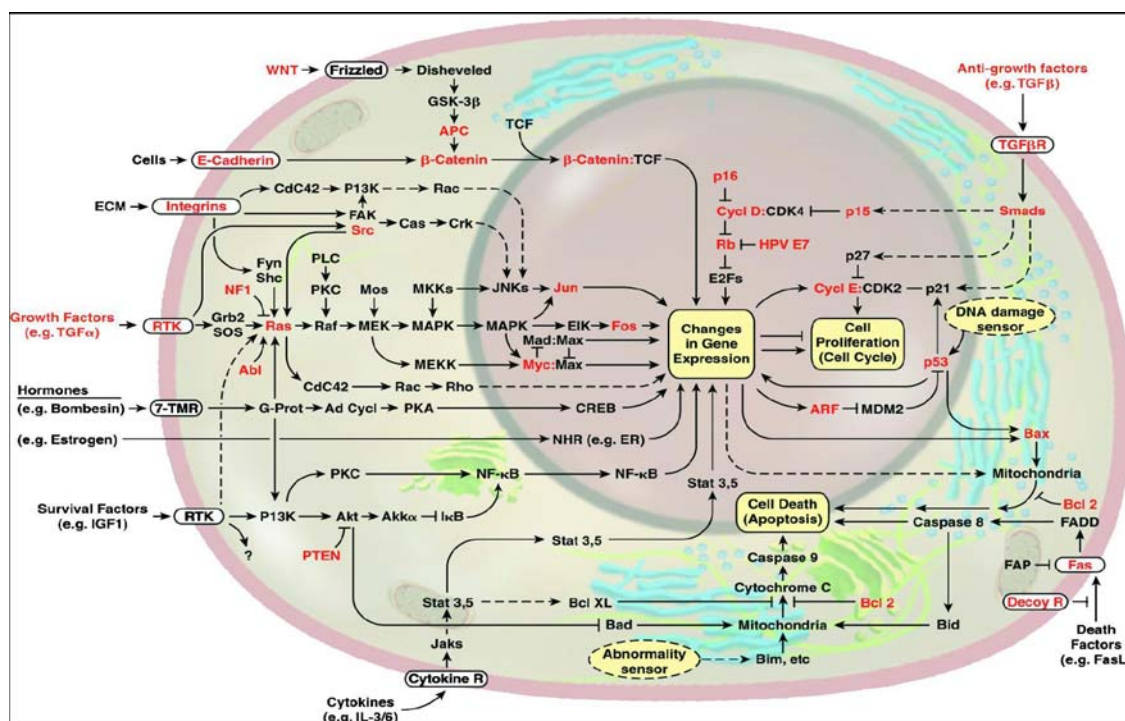
Η έρευνα στη μοριακή βιολογία, τη γενωμική, και την πρωτεομική έχει εξασφαλίσει και θα συνεχίσει να παράγει, έναν πλούτο στοιχείων περιγράφοντας τα στοιχειώδη συστατικά τέτοιων δικτύων, όπως και τη χαρτογράφηση των δια- και μεσο-κυτταρικών δικτύων σημάτων. Το γονιδίωμα κωδικοποιεί, μέσω μιας συγκεκριμένης σειράς των τεσσάρων

πιθανών βάσεων (A, T, C, G) στην ακολουθία του DNA, έναν κατάλογο μερών για τις πρωτεΐνες που είναι ενδεχομένως παρούσες σε κάθε κύτταρο ενός δεδομένου οργανισμού. Η γενωμική έρευνα έχει ως στόχο την πλήρη αποκωδικοποίηση αυτής της πληροφορίας, και για τα μέρη που είναι κοινά για ένα είδος σαν ολότητα και για την καταχώρηση των διαφορών μεταξύ μεμονωμένων μελών. Η μορφή των πρωτεϊνών είναι τι καθορίζει κατά ένα μεγάλο μέρος τη λειτουργία τους, και έτσι η διευκρίνιση για την τρισδιάστατη δομή τους είναι ένας στόχος της πρωτεομικής έρευνας. Πρωτεΐνες, οι οποίες αλληλεπιδρούν η μία με την άλλη, είναι τα αρχικά συστατικά των ζωντανών πραγμάτων. Μεταξύ άλλων ρόλων, διαμορφώνουν τους δέκτες που δίνουν στο κύτταρο ικανότητες αντίληψης, ενεργοποιητές που κάνουν τους μυς να κινηθούν (μυοσίνη, ακτίνιο), ανιχνευτές για το ανοσοποιητικό σύστημα, ένζυμα που καταλύουν χημικές αντιδράσεις, και τους διακόπτες που ενεργοποιούν ή απενεργοποιούν τα γονίδια. Παρέχουν επίσης δομική υποστήριξη και βοήθεια στις μεταφορές μικρότερων μορίων, καθώς επίσης και στην διεύθυνση της αποσύνθεσης και της επανασυναρμολόγησης άλλων κυτταρικών στοιχείων όπως τα λιπίδια και τα σάκχαρα. (Μια ενδιαμέση σύνδεση μεταξύ γενετικών πληροφοριών και των πρωτεϊνών που κωδικοποιεί το DNA είναι το RNA. Μέχρι πρόσφατα, το RNA δεν θεωρήθηκε άμεσος φορέας στους μηχανισμούς ελέγχου κυττάρων, αλλά η έρευνα σε μικροRNA που έγινε μέσα στα προηγούμενα δύο έτη αναγκάζει μια πλήρη επανεξέταση του ρόλου τους.) Μεγάλα ποσά στοιχείων παράγονται από προγράμματα γενωμικής και πρωτεομικής, που διευκολύνονται από περίπλοκα γενετικά εργαλεία εφαρμοσμένης μηχανικής (knock-outs και εισαγωγές γονιδίων, PCR), και τεχνολογίες μέτρησης (πράσινη φθοριούχος πρωτεΐνη, microarrays, FRET), και υπάρχει μια ευρέως αναγνωρισμένη ανάγκη να οργανωθούν και να ερμηνευθούν αυτά τα στοιχεία.

Το παράδειγμα θεωρίας-συστημάτων και ελέγχου των συστημάτων εισόδου/εξόδου, που αποτελείται από απλούστερα συστατικά που διασυνδέονται σύμφωνα με ορισμένους κανόνες, είναι το φυσικότερο σε αυτό το πλαίσιο. Τα κύτταρα λαμβάνουν τις εξωτερικές πληροφορίες μέσω των εισόδων που μπορούν να είναι φυσικές (UV ή άλλη ακτινοβολία, μηχανική, ή θερμοκρασία) καθώς επίσης και χημικές (φάρμακα, παράγοντες αύξησης, ορμόνες, θρεπτικές ουσίες), και τα μετρήσιμα αποτελέσματά τους περιλαμβάνουν χημικά σήματα σε άλλα κύτταρα, τη μετακίνηση του μαστίγιου ή των ψευδοπόδιων, η ενεργοποίηση των παραγόντων μεταγραφής, και ούτω καθ'εξής. Κάθε κύτταρο μπορεί να, αν και αποτελείται από έναν μεγάλο αριθμό υποσυστημάτων, εμπλακεί σε διαδικασίες όπως η αύξηση κυττάρων και η

συντήρηση, η διαίρεση και ο θάνατος. Πράγματι, ένα σημαντικό θέμα στην πρόσφατη λογοτεχνία της μοριακή βιολογίας [7] είναι η προσπάθεια να γίνει κατανοητή η συμπεριφορά των κυττάρων από την άποψη των σειριακών συνδέσεων και των διασυνδέσεων ανάδρασης των στοιχειωδών "υπομονάδων".

Σαν απλή απεικόνιση, εξετάστε το διάγραμμα που παρουσιάζεται στο Κεφάλαιο 4, Εικόνα 1, εξαγόμενο από την επιστημονική ανακοίνωση για την έρευνα του καρκίνου [6], το οποίο περιγράφει το διάγραμμα σύνδεσης της ανάπτυξης λεπτομερούς σχεδίου κυκλώματος σημάτων του θηλαστικού κυττάρου. Φυσικά, μια τέτοια εικόνα παραλείπει πολλές πληροφορίες, μερικές γνωστές αλλά παραλείπονται για απλότητα, και μερικές άγνωστες: ένα μεγάλο μέρος του συστήματος δεν έχει προσδιοριστεί ακόμα, και οι αριθμητικές τιμές των περισσότερων παραμέτρων καθώς επίσης και οι λειτουργικές μορφές των αλληλεπιδράσεων είναι γνωστές μόνο πολύ προσεγγιστικά. Εντούτοις, συλλέγονται στοιχεία κατά ένα καταπληκτικό ποσοστό και συνεχώς λαμβάνονται καλύτερα μοντέλα.



Σχήμα 3.1 Το διάγραμμα σύνδεσης της ανάπτυξης λεπτομερούς σχεδίου κυκλώματος σημάτων του θηλαστικού κυττάρου, από [6] με άδεια από τον Elsevier.

Πολλές από τις φυσικές συστηματο-θεωρητικές ερωτήσεις που κάποιος θα έθετε κανονικά για ένα τέτοιο σύστημα είναι ακριβώς εκείνες που ρωτούν οι κορυφαίοι βιολόγοι, εάν και μερικές φορές σε μια διαφορετική γλώσσα: Τι είναι ξεχωριστό σχετικά με τις ικανότητες επεξεργασίας πληροφορίας ή τις συμπεριφορές εισόδου/εξόδου, τέτοιων δικτύων, και πώς κάποιος χαρακτηρίζει αυτές τις συμπεριφορές; Πώς διαφορετικά pathways μεταγωγής σήματος αλληλεπιδρούν; Πώς κάποιος βρίσκει τις μορφές αντιδράσεων, και τις τιμές των παραμέτρων (προσδιορισμός, αντίστροφη εφαρμοσμένη μηχανική); Όταν αυτές οι μορφές αντιδράσεων είναι γνωστές, πώς κάποιος υπολογίζει τις χρονικά μεταβαλλόμενες εσωτερικές καταστάσεις, όπως οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών και άλλων χημικών ουσιών, από τα πειράματα εισόδου/εξόδου (πρόβλημα παρατηρητή); Ποια υποσυστήματα εμφανίζονται επανειλημμένα; Που βασίζονται οι κύριες ευαισθησίες που επηρεάζουν την ευρωστία του συστήματος; Ποιος είναι ο λόγος που υπάρχουν σειριακές συνδέσεις και βρόχοι ανάδρασης πληροφοριών; Γενικότερα, τι μπορεί να πει κάποιος, αν μη τι άλλο για τη σταθερότητα, τις ταλαντώσεις και άλλες δυναμικές ιδιότητες τέτοιων σύνθετων συστημάτων; Εκτός από ερωτήσεις ανάλυσης, υπάρχουν, φυσικά, επίσης και ερωτήσεις σύνθεσης, που εξετάζουν τον έλεγχο των κυτταρικών συστημάτων μέσω φαρμάκων ή γενετικών τροποποιήσεων. Εντούτοις, το γεγονός είναι ότι ο τομέας της Βιολογίας Συστημάτων, όπως θα δούμε με περισσότερες λεπτομέρειες στο Κεφάλαιο 4, είναι ακόμα άγουρος, και μια σημαντική και μακροπρόθεσμη ερευνητική προσπάθεια θα συνεχιστεί προς τη λύση των ανωτέρω τύπων προβλημάτων.

3.2 SIGNALING PATHWAYS

3.2.1 Ο λόγος της δημιουργίας των signaling pathways [1]

Η πρόοδος στη μοριακή βιολογία, τη γενωμική και την πρωτεομική έχει αποφέρει έναν πλούτο πληροφοριών σχετικά με την υποκείμενη μοριακή βάση του καρκίνου. Ενώ η ακριβής φύση και οι μηχανισμοί που κρύβονται κάτω από αυτή την αρρώστια δεν είναι γνωστά, ένα μεγάλο μέρος επιστημονικών στοιχείων έχει αποδείξει ότι τα signaling pathways και η επικοινωνία μεταξύ τους, είναι κρίσιμα για τη γένεση και την εξάπλωση του καρκίνου.

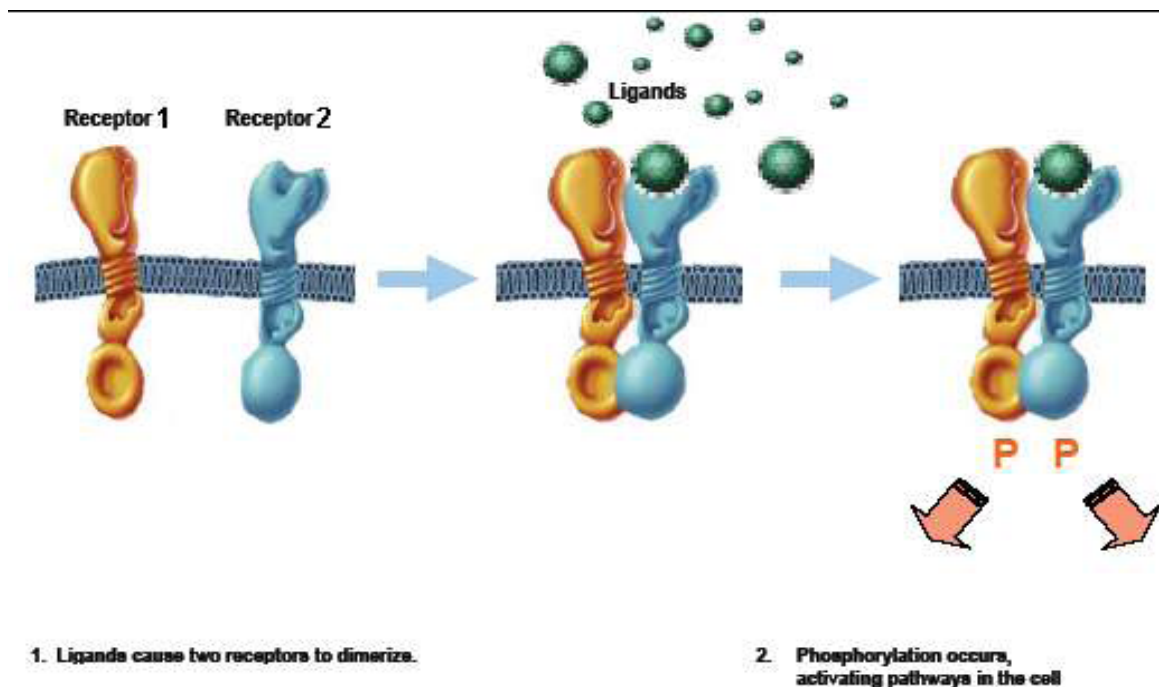
Βασισμένοι σε αυτήν την πρόοδο, έχει προκύψει η έννοια της "εξατομικευμένης ιατρικής", υποσχόμενη τη δυνατότητα να αναπτυχθούν και να διαχειριστούν ειδικές θεραπείες για συγκεκριμένους τύπους καρκίνου σε συγκεκριμένα άτομα. Ενώ η δυνητικότητα αυτής της προσέγγισης για τη θεραπεία του καρκίνου παραμένει ισχυρή, πρόσφατα προγνωστικά και διαγνωστικές μέθοδοι δεν έχουν αποδειχθεί αποτελεσματικές στην αναγνώριση, την περιγραφή και στην επιλογή της πιο κατάλληλης ομάδας ασθενών για να γίνει δυνατή η σύνδεση μεταξύ θεραπείας και ασθενή που υπόσχεται η προσέγγιση της εξατομικευμένης ιατρικής.

Με την πρόσφατη αποκρυπτογράφηση του Ανθρώπινου Γονιδιώματος (Human Genome) η έρευνα στο πεδίο της φαρμακογενωμικής επεκτείνεται γρήγορα. Η ανάπτυξη της φαρμακογενωμικής είναι μια αυξανόμενη ανάγκη για να ποσολογηθεί και να μετρηθεί ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνικών στόχων και γεγονότων ενεργοποίησης σε κανονικά και ασθενή κύτταρα. Και στις δύο περιπτώσεις, οι επιστήμονες εργάζονται για να συσχετίσουν την έκφραση ενός γονιδίου ή μιας πρωτεΐνης με μια συγκεκριμένη ασθένεια με την ελπίδα της χρησιμοποίησης αυτών των πληροφοριών για την ανάπτυξη νέων και αποτελεσματικότερων θεραπειών. Ενώ οι ερευνητές διεξάγουν αναλύσεις και για τα γονίδια και για τις πρωτεΐνες για να κερδίσουν ένα περιεκτικότερο προφίλ της δραστηριότητας των κυττάρων όγκου, μόνο μέσω μιας κατανόησης των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που γίνονται στην επιφάνεια ενός κυττάρου όγκου και στα εσωτερικά του pathways, μπορούν οι συγκεκριμένες θεραπείες να αναπτυχθούν και παραδοθούν με βέλτιστη αποτελεσματικότητα. Ενώ η ανάλυση γονιδίων μπορεί κάποια μέρα να προβλέψει τι μπορεί να γίνει, οι πρωτεΐνες παρέχουν αμεσότερη διορατικότητα σε αυτό που πραγματικά συμβαίνει ανάμεσα στα κύτταρα και στα signaling pathways.

Πρωτεϊνικοί στόχοι μπορεί να βρεθούν μέσα σε ένα κύτταρο, να εκκρίνονται από ένα κύτταρο ή στην επιφάνεια ενός κυττάρου και μπορεί να συνδεθούν ή να αλληλεπιδράσουν με πολλές άλλες πρωτεΐνες. Η ανάλυση διάφορων πρωτεϊνικών στόχων και των αλληλεπιδράσεών τους είναι απαραίτητη στην πλήρη κατανόηση της βιολογίας ενός συγκεκριμένου όγκου, και ως εκ τούτου της συγκεκριμένης θεραπείας που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να τον θεραπεύσει.

3.2.2 Καθορισμός - προδιαγραφή του ρόλου των signaling pathways [13]

Η μεταγωγή σημάτων είναι ένας τρόπος με τον οποίο το ένα κύτταρο επικοινωνεί με το άλλο και με εξωτερικά ερεθίσματα. Η επικοινωνία μεταξύ των δύο κυττάρων περιλαμβάνει έναν μοριακό αγγελιοφόρο (συνδέτης, ligand) από τον αποστολέα και μια περιοχή στην κυτταρική μεμβράνη (δέκτης, receptor) που λαμβάνει το σήμα. Όταν το σήμα έχει ληφθεί, περνιέται μπροστά και το μήνυμα διαβιβάζεται από την εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου στον πυρήνα του. Ένα signaling pathway διαβιβάζει πληροφορίες μέσω ενός κυττάρου δια μέσω μιας σειράς βημάτων που περιλαμβάνουν τη συναρμολόγηση και την αποσύνθεση των πρωτεϊνών και των πρωτεϊνικών συνθέσεων.



Σχήμα 3.2 Επικοινωνία μεταξύ δύο κυττάρων, από [13].

Τα μηνύματα μπορούν να είναι υγιή ή επιβλαβή. Παραδείγματος χάριν, μερικά μηνύματα μπορεί να χρησιμοποιηθούν από το ανοσοποιητικό σύστημα για να αυξήσουν το

ποσό των λευκών αιμοσφαιρίων που χρειάζονται για να σταματήσουν μια μόλυνση. Σε άλλες περιπτώσεις, τα σήματα μπορούν να προκαλέσουν τα κύτταρα να αποθηκεύσουν υλικά όπως λιπαρά οξέα, το οποίο είναι υγιές σε μετριασμό, αλλά όταν είναι ανεξέλεγκτο μπορεί να οδηγήσει στην παχυσαρκία. Σε όλα τα κύτταρα, κάποιο επίπεδο αύξησης (signaling) είναι κανονικό και ένα μέρος του κανονικού κύκλου κυττάρων. Είναι η υπερενεργοποίηση αυτών των σημάτων – ή η αποτυχία να αντισταθμίσουμε ή να εμποδίσουμε εκείνα τα σήματα – που οδηγεί στην ανεξέλεγκτη αύξηση (δηλ. καρκίνος). Οι signaling cascades ρυθμίζουν την ανάπτυξη του κυττάρου, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση σαν μια λειτουργία των σύνθετων εξωκυτταρικών εναυσμάτων. Ο καρκίνος προκύπτει από αποσυντονισμό τέτοιων διαδικασιών. Ως εκ τούτου, η αιτιολογία για την πραγματοποίηση βασικής έρευνας στους signaling cascades και στην βιολογία κυττάρων είναι ότι αυτό τελικά θα οδηγήσει σε νέες προσεγγίσεις στην πρόληψη, τη διάγνωση και τη θεραπεία του ανθρώπου καρκίνου. Η μεταγονιδιακή εποχή θα επιτρέψει τη σκιαγράφηση σύνθετων signaling pathways και θα αποκαλύψει τις περίπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επισκευής του DNA, της αντιγραφής, της μεταγραφής, της δυναμικής της χρωματίνης, της προόδου του κύκλου των κυττάρων και της απόπτωσης.

Ο προσδιορισμός ενός signaling pathway είναι το πρώτο, κρίσιμο βήμα προς την κατανόηση μιας συγκεκριμένης ασθένειας. Η ενεργοποίηση ή η παρεμπόδιση ενός pathway οδηγεί σε μια αλλαγή της ποσότητας ή της θέσης των συγκεκριμένων πρωτεϊνικών συνθέσεων. Ενώ η γενετική γνώση είναι σημαντική, η κατανόηση των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν μέσα σε αυτά τα pathways είναι κρίσιμη για τον καθορισμό της συγκεκριμένης ασθένειας και για το πώς ενεργοποιείται το pathway. Μια βασική αντίδραση της κυτταρικής επεξεργασίας σήματος παρέχεται με αντιστρέψιμη πρωτεϊνική φωσφοροποίηση, που καταλύεται από από μία ποικιλία πρωτεϊνικών κινάσεων. Χρησιμοποιώντας την πρωτεϊνική κινάση A (Kinzel) ως παράδειγμα, ο μηχανισμός της πρωτεϊνικής φωσφοροποίησης μελετάται σε ατομική ανάλυση για να αναπτυχθούν ATP-competitors (ανταγωνιστές) που εμποδίζουν συγκεκριμένες περιοχές πρωτεϊνικών κινάσεων. Η ύπαρξη των εκτο-πρωτεϊνικών κινάσεων και των υποστρωμάτων τους δείχνει ότι η φωσφοροποίηση χρησιμεύει ως ένα ισχυρό εργαλείο για να εμποδίσει την αύξηση των μετασχηματισμένων κυττάρων. Η πρωτεϊνική κινάση CK2 έχει σημαντικούς ρόλους στο

συντονισμό του κύκλου των κυττάρων. Ο συντονισμός του θηλαστικού CK2 εξετάζεται από προωθητική ανάλυση καθώς επίσης και με προσδιορισμό των πρωτεϊνών που προσδένονται σε τετραμερή CK2. Ισοένζυμα πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC) ρυθμίζουν συγκεκριμένα την κυτταρική ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση και είναι πιθανοί μεσολαβητές για τους υποκινητές όγκου.

3.2.3 Φωσφοροποίηση στα signaling pathways

Όπως έχουμε ήδη πει, ότι η φωσφοροποίηση είναι το κύριο κλειδί για την ενεργοποίηση του pathway. Ορίζεται ως η διαδικασία πρόσθεσης μιας ομάδας φωσφορικού άλατος σε ένα μόριο. Αυτό συνήθως ενεργοποιεί το μόριο με την αλλαγή της μορφής ή του φορτίου του και του επιτρέπει να συμμετέχει σε μια χημική αντίδραση. Η δραστηριότητα πολλών πρωτεϊνών ρυθμίζεται με τη φωσφοροποίηση του υδροξυλίου που περιέχει υπολείμματα (σερίνη, θρεονίνη, τυροσίνη) από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσεις. Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η πρωτεϊνική φωσφοροποίηση είναι πιθανώς το σημαντικότερο ρυθμιστικό γεγονός. Πολλά ένζυμα και δέκτες ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται με τη φωσφοροποίηση και την αποφωσφοροποίηση. Η φωσφοροποίηση καταλύεται από διάφορες συγκεκριμένες πρωτεϊνικές κινάσεις, ενώ οι φωσφατάσεις αποφωσφοροποιούν.

Κατά το σήμα απενεργοποίησης, η πρωτεΐνη αποφωσφοροποιείται πάλι και σταματά να εργάζεται. Αυτό είναι ο μηχανισμός σε πολλές μορφές μεταγωγής σήματος, παραδείγματος χάριν ο τρόπος με τον οποίο το εισερχόμενο φως υποβάλλεται σε επεξεργασία μέσα τα φωτοευαίσθητα κύτταρα του αμφιβληστροειδή.

Το δίκτυο που απαιτείται για τη φωσφοροποίηση μπορεί να είναι πολύ σύνθετο. Σε μερικά κυτταρικά signaling pathways, μία πρωτεΐνη Α φωσφοροποιεί τη Β, και η Β φωσφοροποιεί τη Γ, αλλά η Α φωσφοροποιεί επίσης τη Γ άμεσα, και η Β μπορεί να φωσφοροποιεί τη Δ, που μπορεί με τη σειρά της να φωσφοροποιεί την Α. Πιο συγκεκριμένα, στα signaling pathways, οι κινάσεις δεκτών τυροσίνης (RTKs) είναι μεταμεμβρανικές πρωτεΐνες που ρυθμίζουν τις πολυάριθμες πτυχές της φυσιολογίας κυττάρων συμπεριλαμβανομένου του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης. Η πρόσδεση ενός διαλυτού συνδέτη στην εξωκυτταρική περιοχή αυτών των δεκτών προκαλεί χαρακτηριστικά τη διμεροποίηση των δεκτών και τη μεταφωσφοροποίηση της κυτταροπλασματικής καταλυτικής

περιοχής. Αυτή η φωσφοροποίηση τυροσίνης υποκινεί την εγγενή δραστηριότητα κινάσης τυροσίνης του δέκτη και παράγει περιοχές πρόσδεσης για signaling πρωτεΐνες που περιέχουν SH2 περιοχές. Αν και η διμεροποίηση που προκαλείται από το συνδέτη είναι ένα σημαντικό έναυσμα για την ενεργοποίηση του δέκτη, η δραστηριότητα του δέκτη υπόκειται επίσης σε πρόσθετα επίπεδα συντονισμού. Παραδείγματος χάριν, η κυτταροπλασματική περιοχή κοντά στη μεμβράνη των δεκτών κινάσεων τυροσίνης, η οποία βρίσκεται μεταξύ της περιοχής κοντά στη μεμβράνη και της περιοχής της κινάσης, έχει εμπλακεί στον συντονισμό της ενζυματικής δραστηριότητας του δέκτη [23].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ

4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Η βιολογία συστημάτων είναι ένας ανερχόμενος τομέας που στοχεύει στην κατανόηση των βιολογικών συστημάτων σε επίπεδο συστημάτων. Από τις ημέρες του Nordert Weiner (ενός εκ των ιδρυτών του κλάδου), η κατανόηση σε επίπεδο συστημάτων είναι ένας πάγιος στόχος των βιολογικών επιστημών. Η επιστήμη αυτομάτου ελέγχου, παραδείγματος χάριν, στοχεύει στην περιγραφή των ζώων και των μηχανών από τη θεωρία ελέγχου και επικοινωνίας. Δυστυχώς, η μοριακή βιολογία άρχισε μόλις εκείνη την περίοδο, έτσι ώστε μόνο η φαινομενολογική ανάλυση ήταν δυνατή. Μόνο πρόσφατα η ανάλυση σε επίπεδο συστημάτων μπόρεσε να στηριχτεί στις ανακαλύψεις σε μοριακό-επίπεδο. Με την πρόοδο του προγράμματος ακολουθίας γονιδιώματος και την ανάπτυξη άλλων βιολογικών μοριακών προγραμμάτων που επικεντρώνονται στη σε βάθος γνώση της μοριακής φύσης του βιολογικού συστήματος, είμαστε τώρα στο στάδιο για να εξετάσουμε σοβαρά τη δυνατότητα της κατανόησης σε επίπεδο συστημάτων που στηρίζεται σταθερά στην κατανόηση σε μοριακό επίπεδο.

Τι σημαίνει κατανόηση σε "επίπεδο συστημάτων"; Αντίθετα από τη μοριακή βιολογία που εστιάζει σε μόρια, όπως η αλληλουχία νουκλεϊκών οξέων και πρωτεϊνών, η βιολογία συστημάτων εστιάζει σε συστήματα που αποτελούνται από μοριακά συστατικά. Αν και τα συστήματα αποτελούνται από καταστάσεις, η ουσία του συστήματος βρίσκεται στη δυναμική και δεν μπορεί να περιγραφεί μόνο με την απαρίθμηση των συστατικών του συστήματος. Συγχρόνως, είναι παραπλανητικό να θεωρήσουμε ότι μόνο η δομή του συστήματος, όπως οι τοπολογίες δικτύων, είναι σημαντική χωρίς να δώσουμε αρκετή προσοχή στις ποικιλομορφίες και στις λειτουργίες των συστατικών. Και η δομή του συστήματος και τα συστατικά του διαδραματίζουν αναπόφευκτο ρόλο αφού διαμορφώνουν τη συμβιωτική κατάσταση του συστήματος συνολικά.

Μέσα σε αυτό το πλαίσιο, (1) η κατανόηση της δομής του συστήματος, όπως η ρύθμιση γονιδίων και τα βιοχημικά δίκτυα, καθώς επίσης και οι φυσικές δομές, (2) η κατανόηση της δυναμικής του συστήματος, ποσοτική και ποιοτική ανάλυση, καθώς επίσης και κατασκευή θεωρητικού μοντέλου με ικανότητα ισχυρής πρόβλεψης, (3) η κατανόηση των μεθόδων ελέγχου του συστήματος, και (4) η κατανόηση των μεθόδων σχεδίασης του συστήματος, είναι όλα βασικά σημεία ένδειξης του βαθμού κατανόησης του συστήματος.

Υπάρχουν πολλά συναρπαστικά και βαθιά ζητήματα που ερευνώνται ενεργά, όπως η ευρωστία των βιολογικών συστημάτων, οι δομές και η δυναμική δικτύων, και οι εφαρμογές στην ανακάλυψη φαρμάκων. Η βιολογία συστημάτων μπορεί να είναι στα σπάργανα, αλλά αυτή είναι η περιοχή που πρέπει να εξερευνηθεί και η περιοχή που θεωρούμε το κύριο ρεύμα στις βιολογικές επιστήμες αυτόν τον αιώνα [18].

4.2 Η ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΚΑΙ Η ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

Η βιολογία συστημάτων παίρνει μία σημαντική - και συστηματική - προσανατολισμένη προσέγγιση για να περιγράψει τις δυναμικές διαδικασίες μέσα και ανάμεσα στα βιολογικά κύτταρα. Όπως θα δούμε αργότερα, η βιολογία συστημάτων έχει περισσότερο να κάνει με την εφαρμογή των συστημάτων και της θεωρίας ελέγχου στα κυτταρικά συστήματα απ' ό,τι με την εφαρμογή της φυσικής στη βιολογία.

Η βιολογία συστημάτων παρέχει μια ζωτικής σημασίας διεπαφή μεταξύ της κυτταρικής βιολογίας και των βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Όσο η τεχνολογία που παράγει και διαχειρίζεται τα δεδομένα κινείται γοργά, γίνεται προφανές ότι μεθοδολογικές πρόοδοι στην ανάλυση δεδομένων απαιτούνται επείγοντως εάν θέλουμε να μετατρέψουμε τα πρόσφατα διαθέσιμα δεδομένα σε πληροφορίες και γνώση. Αυτή η ανάγκη για έρευνα στις νέες μεθοδολογίες και η ανάπτυξη νέων εννοιολογικών πλαισίων έχουν παραμεληθεί με την ευφορία για τη νέα τεχνολογία. Τα προβλήματα στην μεταγονιδιακή εποχή των βιολογικών επιστημών θα είναι όχι μόνο πειραματικά ή τεχνικά, αλλά και εννοιολογικά. Η ερμηνεία των δεδομένων, το να μετατρέπονται οι πληροφορίες σε γνώση, είναι τόσο σημαντικό για την επιστημονική και βιοτεχνολογική πρόοδο όσο η δυνατότητα για την παραγωγή και τη διαχείριση των δεδομένων. Έτσι, με την παραγωγή απέραντων ποσών δεδομένων, οι επιστήμονες υπολογιστών έχουν γίνει οι φυσικοί σύμμαχοι των βιολόγων στη διαχείριση

αυτών των δεδομένων. Η ανάπτυξη της βιοπληροφορικής παραλληλίζει τις συναρπαστικές εξελίξεις στη βιολογία.

Όπως προαναφέραμε, τα βιολογικά κύτταρα δεν τρέχουν ένα πρόγραμμα, αλλά συνεχώς αντιλαμβάνονται το περιβάλλον τους και παίρνουν αποφάσεις με βάση αυτών των πληροφοριών. Για να καθορίσουμε πώς τα κύτταρα ενεργούν και αλληλεπιδρούν μέσα στο περιβάλλον του οργανισμού για να παράγουν συνεπείς και λειτουργικές ολότητες, πρέπει να καταλάβουμε πώς οι πληροφορίες μεταφέρονται μεταξύ και ανάμεσα στα κύτταρα. Η σηματοδότηση των κυττάρων, ή η "μεταγωγή σημάτων," είναι η μελέτη των μηχανισμών που επιτρέπουν τη μεταφορά των βιολογικών πληροφοριών. Η σηματοδότηση εισβάλλει σε όλες τις πτυχές της βιολογίας, από την ανάπτυξη στην ασθένεια. Πολλές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, περιλαμβάνουν δυσλειτουργία των συστημάτων μεταγωγής σημάτων.

Εκτός από τα προβλήματα μεταξύ των pathways, συστήματα αρνητικής ανάδρασης μπορούν να εμφανιστούν, και η χρονική πορεία ενός συστήματος μεταγωγής σήματος μπορεί να γίνει επικίνδυνη. Είναι επομένως σημαντικό να αναπτυχθούν πειραματικές τεχνικές που επιτρέπουν ποσοτικές μετρήσεις των πρωτεϊνών και των πρωτεϊνικών αλληλεπιδράσεων. Η μαθηματική σχεδίαση και η προσομοίωση σε αυτόν τον τομέα έχει σκοπό να βοηθήσει και να καθοδηγήσει το βιολόγο στο σχεδιασμό των πειραμάτων και γενικά να θεσπίσει ένα εννοιολογικό πλαίσιο σκέψης.

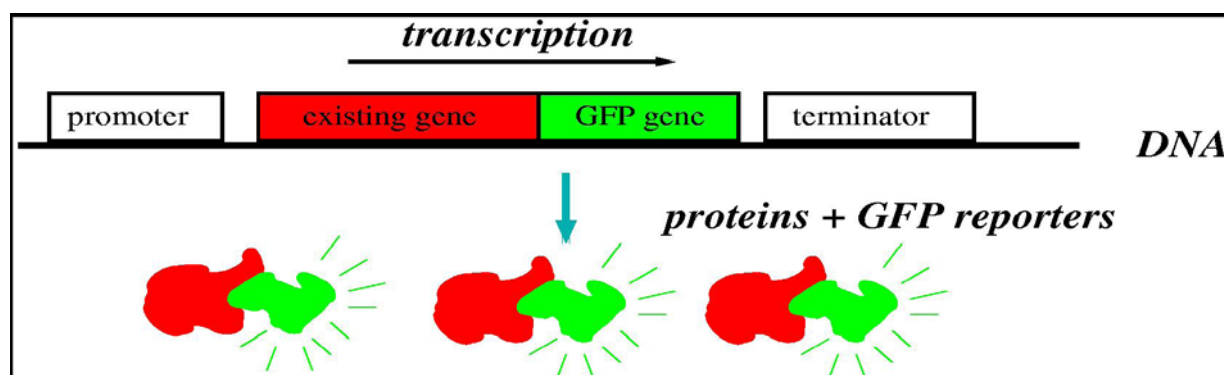
Η πρόοδος από τα μερικώς περιγραφικά μοντέλα στα προβλεπτικά μοντέλα θα απαιτεί την ενσωμάτωση της ανάλυσης δεδομένων και της μαθηματικής σχεδίασης με τις πληροφορίες που αποθηκεύονται σε βιολογικές βάσεις δεδομένων. Τα δεδομένα που έχουμε αυτήν την περίοδο διαθέσιμα δεν επιτρέπουν τεχνικές προσδιορισμού παραμετρικών συστημάτων για να φτιαχτούν προβλεπτικά μοντέλα. Αντ' αυτού, είναι η νοοτροπία των συστημάτων, η ίδια η διαδικασία σχεδίασης, η οποία συχνά αποδεικνύεται χρήσιμη [21].

4.2.1 Τεχνικές μέτρησης [17]

Μεγάλα ποσά στοιχείων παράγονται από προγράμματα γενωμικής και πρωτεομικής, χάρη σε περίπλοκα εργαλεία γενετικής μηχανικής (knock-outs και εισαγωγές γονιδίων, PCR) και τεχνολογίες μέτρησης (πρωτεΐνες φθορισμού, microarrays, μέθοδος κηλίδων, FRET). Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσεων (PCR) είναι μια τεχνική που ενισχύει το DNA

(χαρακτηριστικά ένα γονίδιο ή ένα μέρος ενός γονιδίου). Δημιουργώντας πολλαπλάσια αντίγραφα ενός κομματιού του DNA, το οποίο ειδικά θα υπήρχε σε πάρα πολύ μικρή ποσότητα για να ανιχνευτεί, η PCR επιτρέπει τη χρήση τεχνικών μέτρησης. Εν συντομία ας συζητήσουμε μερικές από αυτές τις τεχνολογίες μέτρησης, προκειμένου να παρασχεθεί μια ιδέα της δύναμής τους καθώς επίσης και των αυστηρών περιορισμών τους.

Ας υποθέσουμε ότι επιθυμούμε να ξέρουμε σε ποιο ποσοστό ένα ορισμένο γονίδιο X μεταγράφεται κάτω από ένα συγκεκριμένο σύνολο συνθηκών στις οποίες βρίσκεται το κύτταρο. Για αυτό τον σκοπό μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι πρωτεΐνες φθορισμού. Παραδείγματος χάριν, η πράσινη πρωτεΐνη φθορισμού (GFP) είναι μια πρωτεΐνη με την ιδιότητα ότι φθορίζει σε πράσινο όταν εκτίθεται στο υπεριώδες φως (UV). Παράγεται από τη μέδουσα *Aequoria victoria* και το γονίδιό της έχει απομονωθεί έτσι ώστε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως γονίδιο αναφοράς. Το γονίδιο GFP παρεμβάλλεται (κλωνοποιημένο) στο χρωμόσωμα, δίπλα ή πολύ κοντά στη θέση του γονιδίου X, έτσι και τα δύο ελέγχονται από την ίδια περιοχή υποκίνησης. Κατά συνέπεια, τα γονίδια X και GFP μεταγράφονται ταυτόχρονα και έπειτα μεταφράζονται (Σχήμα 4.1), και έτσι με τη μέτρηση της έντασης του φωτός GFP που εκπέμπεται μπορεί να υπολογισθεί η ποσότητα του X που εκφράζεται.

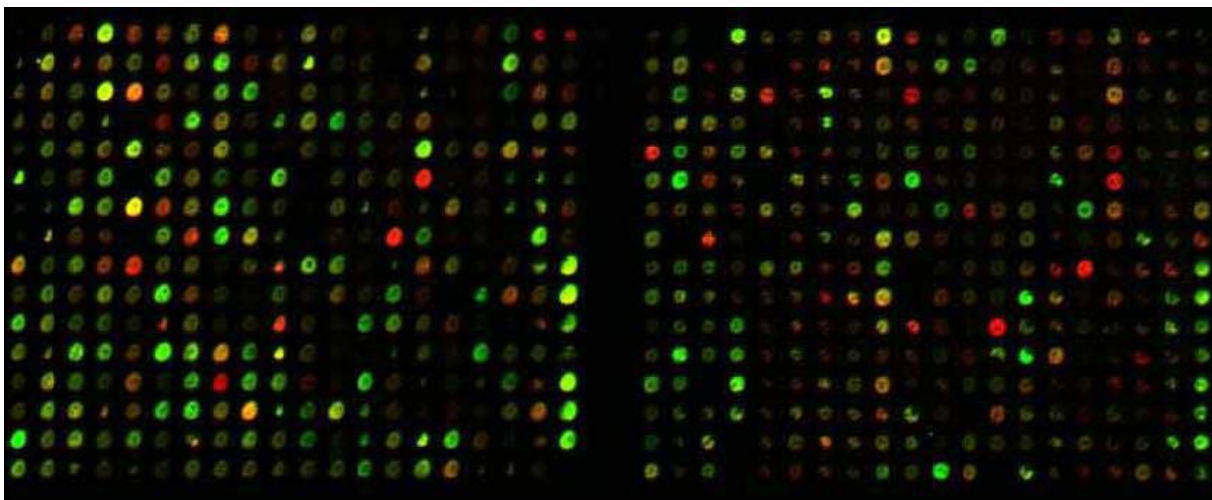


Σχήμα 4.1: GFP, από [17].

Οι μέθοδοι φθορισμού πρωτεΐνης είναι ιδιαίτερα χρήσιμες όταν συνδυάζονται με τη ροή κυτταρομετρίας. Οι συσκευές ροής κυτταρομετρίας μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ταξινόμηση μεμονωμένων κυττάρων σε διαφορετικές ομάδες, βάσει χαρακτηριστικών όπως το μέγεθος των κυττάρων, τη μορφή, ή το ποσό μετρημένου φθορισμού, και σε ρυθμούς μέχρι

και χιλιάδες κύτταρα ανά δευτερόλεπτο. Με αυτόν τον τρόπο, είναι δυνατό, παραδείγματος χάριν, να μετρηθεί πόσα κύτταρα σε έναν πληθυσμό εκφράζουν ένα ιδιαίτερο γονίδιο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.

Ένα σύνολο τεχνολογιών καλούμενων συλλογικά ως πίνακες γονιδίων (τσιπ DNA, DNA microarrays, τσιπ γονιδίων Affymatrix) παρέχουν τις μεθόδους υψηλής-ρυθμοαπόδοσης για ταυτόχρονη παρακολούθηση των επιπέδων δραστηριότητας χιλιάδων γονιδίων, παρέχοντας κατά συνέπεια ένα στιγμιότυπο της τρέχουσας δραστηριότητας γονιδιακής έκφρασης ενός κυττάρου (Σχήμα 4.2). Ένας πίνακας φτιάχνεται χρησιμοποιώντας εξοπλισμό ρομποτικής και απεικόνισης, όπως στην ηλεκτρονική επεξεργασία ενός τσιπ. Ο πίνακας έχει μέσα σε κάθε θέση (i, j) ένας ανιχνευτή "συντονισμένο" σε ένα συγκεκριμένο γονίδιο ή σε μια μικρή ακολουθία νουκλεοτιδών X_{ij} . Αυτός ο ανιχνευτής (το συνηθισμένο όνομα είναι ένας "στόχος") είναι το συμπλήρωμα X'_{ij} του X_{ij} ή, πιθανότερα, μιας υπο-ακολουθίας του X_{ij} . (Συγκεκριμένα, κάποιος θέλει να ανακαλύψει πόσο του mRNA ενός συγκεκριμένου X μεταγράφεται. Το πρώτο βήμα είναι να μεταγραφεί αντίστροφα το RNA στο DNA, που γίνεται συμπληρωματικό DNA (cDNA), και έπειτα ενισχύεται με PCR. Παραλείπουμε τις λεπτομέρειες εδώ, δεδομένου ότι θέλουμε μόνο να εξηγήσουμε τη βασική αρχή.) Λόγω της υβριδοποίησης, δηλαδή των ενώσεων των βάσεων A-T και G-C του DNA, το X_{ij} θα "κολλήσει" στο συμπλήρωμά του X'_{ij} . Αυτό επιτρέπει να υπολογιστεί η παρουσία και η αφθονία του κάθε X_{ij} σε ένα δείγμα. Προκειμένου να είμαστε σε θέση να διαβάσουμε τις πληροφορίες στις διαφορετικές θέσεις του πίνακα, οι ακολουθίες X_{ij} που εξετάζονται ταξινομούνται πρώτα κατά ραδιενέργεια ή φθορισμό, έτσι ώστε κάποιος να μπορεί απλά να μετρήσει πόσο έχει συσσωρευθεί σε κάθε θέση i, j . Αναγνώριση σχεδίων, γνώση μηχανών, και εργαλεία θεωρίας-ελέγχου όπως η συγκέντρωση, τα Μπεϋζιανά δίκτυα και η θεωρία προσδιορισμού - ειδικά όταν είναι διαθέσιμα χρονικά εξαρτώμενα στοιχεία - μπορούν να είναι και χρησιμοποιούνται για να συμπεράνουν πληροφορίες για τις δυναμικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων, και να ταξινομήσουν ποια ιδιαίτερα σύνολα γονιδίων προκαλούνται ταυτόχρονα ή σε μια ακολουθία (ανάλυση ομο-έκφρασης) σε ανταπόκριση σε διαφορετικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες ή καταστάσεις ασθενειών.

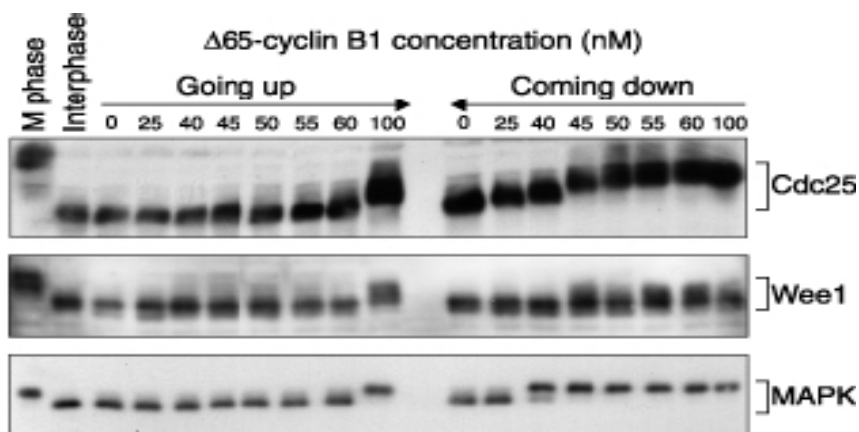


Σχήμα 4.2: Σειρά γονιδίων, από [17].

Πραγματικά, είναι δύσκολο να ληφθούν απόλυτες μετρήσεις με τους πίνακες γονιδίων, λόγω των αβεβαιοτήτων στις διαδικασίες PCR και υβριδοποίησης. Κατά κάποιο τρόπο, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συχνά με έναν συγκριτικό τρόπο. Πειράματα πίνακα γονιδίων μπορούν να γίνουν για διαφορετικούς τύπους κυττάρων στον ίδιο οργανισμό, για τους ίδιους τύπους κυττάρων κάτω από διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, ή ακόμα και για τη σύγκριση κυττάρων από δύο οργανισμούς, ίσως ένας από τους οποίους να έχει μια κατασκευασμένη μετάλλαξη από τον αρχικό. Μια συναρπαστική εφαρμογή είναι η σύγκριση των ανώμαλων (π.χ., καρκινογόνων) και κανονικών κυττάρων, λαμβάνοντας με αυτόν τον τρόπο μια "υπογραφή" γονιδιακής έκφρασης που να χρησιμοποιηθεί για διάγνωση.

Οι κηλίδες Western (Western blots) επιτρέπουν την ανίχνευση της παρουσίας μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης, ή έναν μικρό αριθμό της, σε ένα δείγμα που λαμβάνεται από κάποιο πείραμα. Οι πρωτεΐνες που εξάγονται από το δείγμα, μαζί με έναν μικρό αριθμό αντισωμάτων που αναγνωρίζουν μόνο συγκεκριμένες πρωτεΐνες, τοποθετούνται σε μεμβράνες και αφήνονται να αλληλεπιδράσουν. Διαφορετικές μέθοδοι, παραδείγματος χάριν το ραδιενεργό μαρκάρισμα των κηλίδων, χρησιμοποιείται έπειτα προκειμένου να απεικονιστούν τα αποτελέσματα. Για παράδειγμα, το σχήμα 4.3, δείχνει στοιχεία κηλίδων Western από ένα πείραμα στο οποίο τρεις πρωτεΐνες (Cdc25, Wee1, και MAPK) έχουν παρατηρηθεί υπό διαφορετικές συνθήκες (συγκεντρώσεις 0, 25nM, κ.λ.π.) από μια άλλη πρωτεΐνη που λέγεται

Δ65-cyclin B1, κατά τη διάρκεια δύο πειραμάτων (επονομαζόμενων "going up" και "coming down" στο σχήμα). Οι υψηλότερες τοποθετήσεις στις κηλίδες αντιστοιχούν σε αυτήν την περίπτωση στη σχετική αφθονία της φωσφοροποιημένης μορφής της πρωτεΐνης, παραδείγματος χάριν, η φωσφοροποιημένη Cdc25 είναι αφθονότερη στην τιμή "100" απ'ό,τι στη "0".



Σχήμα 4.3: Κηλίδες Western, από [17].

4.2.2 Περιορισμοί [17]

Παρά τη δύναμη των τεχνικών που μόλις περιγράφηκαν, GFP, πίνακες, και κηλίδες, είναι πραγματικά πολύπλοκες, λόγω των χημικών αλληλεπιδράσεων στις κηλίδες, των λαθών παραγωγής στους πίνακες, ή άλλων πηγών παρέμβασης. Επιπλέον, οι προκύπτουσες μετρήσεις έχουν χαμηλή ακρίβεια: πολύ λίγα κομμάτια των πληροφοριών μπορούν να εξαχθούν από στοιχεία όπως αυτά που παρουσιάζονται στα σχήματα 4.2 ή 4.3. Αυτοί οι περιορισμοί της ανακρίβειας και της πολυπλοκότητας μερικές φορές αγνοούνται στη μοντελοποίηση της βιολογίας συστημάτων, αλλά είναι προφανώς άσκοπη η προσπάθεια ακριβής προσαρμογής των παραμέτρων του μοντέλου σε τέτοια στοιχεία. Από τη άλλη μεριά, για ορισμένους τύπους ποσοτήτων, όπως το ποσό ασβεστίου σε ένα κύτταρο, ρεύματα μέσω καναλιών, ή ορισμένες ενζυμικές συγκεντρώσεις, υπάρχουν άλλες τεχνικές που μπορούν να

οδηγήσουν σε μετρήσεις υψηλότερης ακρίβειας. Σε τέτοιες περιπτώσεις, η προσαρμογή παραμέτρου είναι λογικότερη.

Ο τομέας αυτός όμως πάσχει από το εξής παράδοξο: ενώ αφενός ένα τεράστιο ποσό ποιοτικής γνώσης δικτύων (σχηματική μοντελοποίηση) είναι διαθέσιμο, αφετέρου μικρό ποσοστό αυτής της γνώσης είναι ποσοτικό, τουλάχιστον στο επίπεδο ακρίβειας που απαιτείται από τα περισσότερα εργαλεία ανάλυσης της θεωρίας ελέγχου. Το πρόβλημα της εκμετάλλευσης αυτής της ποιοτικής γνώσης, και της αποτελεσματικής ενσωμάτωσης των σχετικά αραιών ποσοτικών στοιχείων, είναι μεταξύ των πιο προκλητικών ζητημάτων που αντιμετωπίζει η βιολογία συστημάτων.

4.3 MONTEΛΑ ΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ [17]

Δεδομένου ότι πολλοί οργανισμοί ακολουθούν τις ίδιες βασικές αρχές, οι βιολόγοι έχουν επικεντρωθεί σε έναν μικρό αριθμό συστημάτων μοντέλων. Αυτό τους επιτρέπει να εστιάσουν σε συγκεκριμένα συστήματα και να διευκολύνουν τις συγκρίσεις και τη διανομή των ερευνητικών αποτελεσμάτων. Διαφορετικές πτυχές μπορεί να είναι ευκολότερο να μελετηθούν σε διαφορετικά μοντέλα οργανισμών (εμβρυϊκοί κύκλοι σε αυγά βατράχων, διαφοροποίηση και ανάπτυξη σε μύγες, γήρανση σε σκουλήκια), εκμεταλλευόμενοι τη γρήγορη γονιμοποίηση ή την ταχύτητα ωρίμανσης.

Όπως καταχωρείται στην ιστοσελίδα των εθνικών ιδρυμάτων υγείας των ΗΠΑ (<http://www.nih.gov/science/models>), τα κύρια μοντέλα θηλαστικών είναι το ποντίκι και ο αρουραίος, και τα κύρια μοντέλα μη-θηλαστικών είναι τα *S. cerevisiae* (αναπτυσσόμενη μαγιά), *Neurospora* (νηματοειδής μύκητας), *D. discoideum* (τυπική αμοιβάδα), *C. elegans* (νηματοζώο), *D. melanogaster* (φρουτόμυγα), *D. rerio* (ψάρι ζέβρα), και *Xenopus* (βάτραχος). Επιπλέον, ένα δημοφιλές μοντέλο φυτών είναι το *Arabidopsis* (ένα μικρό φυτό, μέλος της οικογένειας του σιναπιού).

Η περισσότερη μαθηματική μοντελοποίηση, επεξεργασία σήματος, και μελέτες ελέγχου ανάδρασης έχουν γίνει συγκεκριμένα για κάποιο από τα παραπάνω αυτά μοντέλα συστημάτων.

4.4 ΤΡΕΧΟΥΣΑ ΕΡΕΥΝΑ

Το ενδιαφέρον για τη βιολογία συστημάτων τεκμηριώνεται με τον αυξανόμενο αριθμό των διασκέψεων, των ερευνητικών ομάδων, και των ιδρυμάτων αφιερωμένων σε αυτόν τον τομέα. Η βιολογία συστημάτων παρέχει απόδειξη της αυξανόμενης συμμετοχής των μηχανικών ελέγχου, όχι μόνο στο τεχνολογικό επίπεδο, αλλά και στην ανάπτυξη των νέων μεθοδολογικών προσεγγίσεων στη μαθηματική σχεδίαση, την προσομοίωση, και στην ανάλυση δεδομένων. Για να επιτρέψουν τις προσομοιώσεις μεγάλης κλίμακας, τα διεθνή προγράμματα αναπτύσσουν μια γλώσσα σήμανσης βιολογίας συστημάτων (systems biology markup language, SBML) και ένα "Systems Biology Workbench" για να επιτρέψουν την ολοκλήρωση των μοντέλων και των εργαλείων προσομοίωσης (<http://www.sbw-sbml.org> για περισσότερες πληροφορίες).

Η κύρια πρόκληση για τις βιοϊατρικές επιστήμες είναι να απαντηθούν οι ακόλουθες ερωτήσεις:

- πώς τα κύτταρα ενεργούν και αλληλεπιδρούν μέσα στο περιβάλλον του οργανισμού για να παράγουν συναφή και λειτουργικές ολότητες;
- πώς τα γονίδια ενεργούν και αλληλεπιδρούν μέσα στο περιβάλλον του κυττάρου για να επιδρούν στη δομή και τη λειτουργία του;

Για τη βιολογία συστημάτων μπορούμε να συνοψίσουμε τις προκλήσεις ως εξής:

- μεθοδολογίες για την εκτίμηση παραμέτρου
- πειραματικές και επίσημες μέθοδοι για την επικύρωση μοντέλου
- προσδιορισμός αιτιολογικών σχέσεων, ανάδρασης και κυκλικότητας από τα πειραματικά δεδομένα
- αρθρωτές αναπαραστάσεις και προσομοίωση δυναμικών συστημάτων μεγάλης κλίμακας
- έρευνες σχετικά με τη σταθερότητα και την ευρωστία κυτταρικών συστημάτων
- απεικόνιση και ένωση πληροφοριών, ολοκλήρωση μοντέλων και προσομοιωτών
- μοντέλα κλίμακας δια μέσου χρονικών διαστημάτων και επιπέδων περιγραφής (από τα γονίδια, τα αντίγραφα, και τις πρωτεΐνες στα κύτταρα και τους οργανισμούς).

Η γονιδιακή έκφραση πραγματοποιείται μέσα στο περιβάλλον ενός κυττάρου και μεταξύ των κυττάρων, των οργάνων, και των οργανισμών. Η προσέγγιση υπεραπλούστευσης είναι για να "απομονώσει" ένα σύστημα, εννοιολογικά "κλείνοντας το" από το περιβάλλον του μέσω

του προσδιορισμού των εισόδων και εξόδων. Με τη χρησιμοποίηση αυτής της προσέγγισης χάνουμε πληροφορίες αναπόφευκτα, αφού οι εξωτερικές δυνάμεις περιγράφονται σαν μια εσωτερική λειτουργία του συστήματος. Διαφορετικά επίπεδα κυτταρικών συστημάτων μπορεί να απαιτήσουν διαφορετικές στρατηγικές σχεδίασης, και τελικά απαιτούμε ένα κοινό εννοιολογικό πλαίσιο που να ενσωματώνει τα διαφορετικά μοντέλα, παραδείγματος χάριν, οι διαφορετικές εξισώσεις παρέχουν ένα ρεαλιστικό παράδειγμα σχεδίασης για ένα μόνο-γονίδιο ή μια μονοκύτταρη αναπαράσταση, αλλά κύτταρο-προς-κύτταρο και μεγάλης κλίμακας δίκτυα αλληλεπίδρασης γονιδίων θα μπορούσαν, παραδείγματος χάριν, να αντιπροσωπευθούν από τα μοντέλα πεπερασμένων καταστάσεων ή χρησιμοποιώντας την προσομοίωση κατά παράγοντες.

Κάποιοι δεν πρέπει να βγάλει το βιαστικό συμπέρασμα ότι η θεωρία ελέγχου και συστημάτων θα μπορούσε να δώσει όλες τις απαντήσεις στις προκλήσεις που δίνονται από τα δυναμικά συστήματα στη μοριακή βιολογία. Στη θεωρία δυναμικών συστημάτων, κάποιος μπορεί συχνά να αγνοήσει τις χωρικές πτυχές. Εντούτοις, ο χρόνος και ο χώρος είναι ουσιαστικοί για εξήγηση της φυσικής πραγματικότητας της γονιδιακής έκφρασης. Το ίδιο συστατικό ενός pathway μπορεί να έχει έναν διαφορετικό λειτουργικό ρόλο ανάλογα με τη θέση του μέσα στο κύτταρο. Αν και τα συστατικά των κυττάρων έχουν συγκεκριμένες θέσεις, αυτές οι θέσεις δεν έχουν ακριβείς συντεταγμένες. Όχι μόνο μεταδίδονται σήματα αλλά τα συστατικά κινούνται επίσης κατά έναν μη τυχαίο τρόπο. Χωρίς χωρική συνεπαγωγή δεν μπορεί να υπάρξει ζωντανό κύτταρο, και για τη βιολογία συστημάτων είναι συνεπώς απαραίτητο να ενσωματώσει μια τοπολογική αντιπροσώπευση αυτής της οργάνωσης με τα μοντέλα της δυναμικής συμπεριφοράς [21].

Γενικά, η αιτιολογία είναι μια αρχή της εξήγησης της αλλαγής στη σφαίρα του θέματος. Στην βιολογία συστημάτων η αιτιολογία ορίζεται ως μια (μαθηματική) σχέση, όχι μεταξύ υλικών αντικειμένων (μόρια), αλλά μεταξύ των αλλαγών των καταστάσεων μέσα και ανάμεσα στα στοιχεία ενός συστήματος. Αντί να προσπαθούμε να προσδιορίσουμε τα γονίδια ως αιτιώδεις παράγοντες για κάποια λειτουργία, ρόλο, ή αλλαγή στο φαινότυπο σχετίζουμε αυτές τις παρατηρήσεις με τις ακολουθίες των γεγονότων. Με άλλα λόγια, αντί να ψάχνουμε για ένα γονίδιο που είναι ο λόγος, η εξήγηση, ή η αιτία κάποιου φαινομένου ψάχνουμε μια εξήγηση στη δυναμική (ακολουθίες γεγονότων σε χρονική σειρά) που οδηγεί σε αυτό [21].

Στην ανάλυση των πειραματικών δεδομένων, στηριζόμαστε συνήθως στις υποθέσεις που γίνονται για το σύνολο δειγμάτων. Μία στατιστική ή "μέση προοπτική," εντούτοις,

μπορεί να κρύψει τα βραχυπρόθεσμα αποτελέσματα που είναι η αιτία για μια ολόκληρη ακολουθία γεγονότων σε μια γενετική διάβαση. Είναι πολύ δύσκολο να ληφθούν αρκετά μεγάλα και αξιόπιστα σύνολα δεδομένων για τη σχεδίαση διαβάσεων· είναι επομένως σημαντικό να συγκρίνουμε διαφορετικές μεθοδολογίες, τις ενδεχόμενες υποθέσεις τους, και τις συνέπειες των βιολογικών ερωτήσεων. Είναι έτσι κυρίαρχης σημασίας ότι προσπαθούμε να γεφυρώσουμε το χάσμα μεταξύ δεδομένων και μοντέλων [21].

4.5 ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ

Η μοντελοποίηση και η προσομοίωση εμφανίστηκαν στον επιστημονικό ορίζοντα πολύ πριν από την εμφάνιση της μοριακής και της κυτταρικής βιολογίας. Αρχικά ο στόχος της μοντελοποίησης ήταν να ερευνηθούν τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των σύνθετων βιολογικών συστημάτων που εμείς μεταχειριζόμαστε ως μαύρα κιβώτια π.χ., καρδιά, εγκέφαλο, και κυκλοφορικό σύστημα, μια έννοια δανειζόμενη από τις φυσικές επιστήμες και την εφαρμοσμένη μηχανική. Για τη μοντελοποίηση βιολογικών συστημάτων σε διάφορα επίπεδα δηλ., μοριακό, κυτταρικό και οργανικό, απαιτούνται διαφορετικές στρατηγικές και τεχνικές. Η βιολογική πολυπλοκότητα απαιτεί το σπάσιμο των συστημάτων σε εύχρηστα συστατικά, αλλά απαιτεί επίσης την συγκέντρωσή τους εκ νέου επειδή μπορεί να προκύψουν συμπεριφορές που δεν μπορούν να κατανοηθούν από τα συστατικά μεμονωμένα. Η επανάληψη μεταξύ του μοντέλου και του πειράματος παρέχει το κλειδί για την εξασφάλιση ότι τα πρότυπα είναι ρεαλιστικά. Λαμβάνοντας υπόψη ότι ερευνητές μπορεί να χρειαστούν μια διαφορετική τεχνική για να μελετήσουν κάθε συστατικό, είναι δύσκολο εάν όχι αδύνατο να αναλάβουν φυσιολογικές μελέτες ολόκληρων συστημάτων στα οποία τα επιμέρους συστατικά ελέγχονται ταυτόχρονα.

Μοντέλα μπορούν να παραχθούν σε διαφορετικές εκδοχές κατά τη διάρκεια του χρόνου και από διαφορετικές ομάδες. Διαφωνίες μπορούν να προκύψουν και παρατηρήσεις μπορούν να αμφισβητηθούν. Διαφορετικοί ερευνητές μπορούν να παράγουν μοντέλα σε διαφορετικές εκδοχές και διαμορφώσεις.

Αυτοί οι απρόβλεπτοι παράγοντες σημαίνουν ότι η βιολογία συστημάτων είναι απίθανο να παράγει ένα σύνολο κανονικών μοντέλων. Μάλλον, θα προκύψει μια σύνθετη

οικολογία μοντέλων που ενσωματώνονται μέσα σε ένα πλαίσιο που επιτρέπει τη συζήτηση και τη συνεργασία μεταξύ των συνεισφερόντων. Τελικά, ο στόχος μας μπορεί να περιλάβει εξατομικευμένα μοντέλα που αποτελούν παραλλαγές στη φυσιολογία, παρά γενικά μοντέλα βιολογικών φαινομένων [14].

4.5.1 Τεχνική μοντελοποίησης

Ας δούμε τώρα μια περίπτωση χρήσης που περιγράφει τη διαδικασία από την οποία ένας ερευνητής επινοεί αρχικά ένα βασικό μοντέλο, και χρησιμοποιεί το λογισμικό για να τον βοηθήσει να βελτιώσει εκείνο το μοντέλο. Ως τμήμα αυτής της περίπτωσης χρήσης, το ίδιο το μοντέλο αναπτύσσεται και περιγράφεται με διάφορες μορφές, από το αρχικό σχέδιο σύνδεσης (wiring diagram) στο αρχικό αρχείο SBML σε ένα μοντέλο που ελέγχεται για να ταιριάζει με τα διαθέσιμα πειραματικά στοιχεία.

Μόλις αποφασίσει ο σχεδιαστής ποια διαδικασία θα διαμορφώσει σε έναν οργανισμό, το επόμενο βήμα είναι να καταχωρηθεί τι είναι γνωστό αυτήν την περίοδο για τη κατάλληλη ποσοτική και ποιοτική συμπεριφορά της διαδικασίας. Ειδικότερα, ο σχεδιαστής θα βρει στη βιβλιογραφία διάφορα κομμάτια πληροφορίας για τη διαδικασία όπως εκτίθεται από τις διάφορες μεταλλάξεις σε πειραματικούς όρους. Τα αναφερόμενα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων θα περιλάβουν πράγματα όπως τη συγκέντρωση των διάφορων χημικών ειδών κατά τη διάρκεια του χρόνου, και ίσως η ποιοτική έκβαση όπως εάν ο οργανισμός ήταν σε θέση να αναπαραγάγει εάν ο κύκλος κυττάρων διαμορφωνόταν. Συλλογικά, αυτές οι πληροφορίες αναφέρονται ως πειραματικά στοιχεία. Τα πειραματικά στοιχεία χρησιμοποιούνται πρώτα από το σχεδιαστή για να αποκτήσει επίγνωση στη φυσιολογική διαδικασία λεπτομερειών που διαμορφώνεται, όπως ακριβώς ποιες χημικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται. Μόλις δημιουργηθεί ένα μοντέλο, τα αποτελέσματα προσομοίωσης από το μοντέλο θα συγκριθούν τελικά με τα πειραματικά στοιχεία για να δουν πόσο "καλό" είναι το μοντέλο.

Το επόμενο βήμα στη δημιουργία ενός μοντέλου είναι να σχεδιαστούν οι σχέσεις μεταξύ των ενεργών χημικών ειδών σε σχέση με τις αντιδράσεις που υποτίθεται ότι συμβαίνουν. Δεδομένου ότι τα είδη τυπικά περιλαμβάνονται σε πολλαπλές αλληλεπιδρώντες αντιδράσεις,

το αποτέλεσμα είναι ένα δίκτυο αντιδράσεων, και το προκύπτον διάγραμμα αναφέρεται ως δίκτυο αντίδρασης ή διάγραμμα καλωδίωσης.

Τυπικά, ο σχεδιαστής θα αρχίσει με το χέρι σχεδιάζοντας το διάγραμμα πάνω σε ένα κομμάτι χαρτί. Εάν ο σχεδιαστής έχει ξοδέψει πολύ χρόνο για να αναπτύξει το διάγραμμα καλωδίωσης, μπορεί να το εισαγάγει σε ένα πρόγραμμα CAD για την ευρύτερη διάδοση όπως σε μια δημοσίευση. Σημειώστε ότι αυτό είναι διαφορετικό από την είσοδο του διαγράμματος σε ένα πρόγραμμα του οποίου σκοπός είναι να υποστηριχθεί η δημιουργία και η δοκιμή των μοντέλων (όπως το JigCell).

Δυστυχώς, το διάγραμμα καλωδίωσης παρέχει μόνο μια ποιοτική περιγραφή για το πώς τα χημικά είδη αλληλεπιδρούν. Μόλις ο σχεδιαστής έχει μια ιδέα για το τι είναι οι αντιδράσεις και πώς αλληλεπιδρούν, το επόμενο βήμα είναι να καθοριστεί το μοντέλο ακριβώς σε σχέση με μια σειρά εξισώσεων αντίδρασης. Σε αυτή τη φάση, μια εξίσωση αντίδρασης πρέπει να περιλάβει όχι μόνο τα είδη που σχετίζονται και την κατεύθυνση της αλληλεπίδρασης, αλλά και έναν νόμο ποσοστού που καθορίζει ποσοτικά ακριβώς πώς η αντίδραση πραγματοποιείται.

Για να είναι πλήρες (και να μπορεί να προσομοιωθεί), πρέπει να εξασφαλισθούν οι τιμές για όλα αυτά τα είδη. Μερικές από αυτές τις τιμές είναι σταθερές που καθορίζουν εν μέρει τον οργανισμό ή κάποια παραλλαγή του οργανισμού (μια μετάλλαξη). Αυτές μπορεί να τις γνωρίζει ο σχεδιαστής εκ των προτέρων. Άλλες, είναι τιμές που ο σχεδιαστής πρέπει να καθορίσει προκειμένου να "προσαρμοστούν" με τα φαινομενολογικά στοιχεία που το μοντέλο έχει σχεδιαστεί για να ταιριάζει. Αυτές καλούνται "παραμέτροι". Ο σχεδιαστής μπορεί είτε να υποθέσει αυτές τις τιμές, είτε μπορεί να χρησιμοποιήσει λογισμικό εκτίμησης παραμέτρου για να καθορίσει τις καλύτερες τιμές. Με κάθε τρόπο, κάποια τιμή πρέπει να καθοριστεί προτού να γίνει η προσομοίωση. Άλλες τιμές ειδών μπορούν να αλλάξουν κατά τη διάρκεια του χρόνου, αλλά χρειάζονται μια αρχική τιμή για την έναρξη της προσομοίωσης (αρχικοί όροι). Ο σχεδιαστής εισάγει όλες αυτές τις πληροφορίες στο μοντέλο προσομοίωσης.

Μόλις καθοριστεί ο οργανισμός αναφοράς από το μοντέλο, ο σχεδιαστής θα πρέπει τυπικά να τρέξει τις προσομοιώσεις για να δει εάν οι εκβάσεις είναι όπως αναμένονται. Για τη σχεδίασή μας, υπάρχουν συνήθως πληροφορίες σχετικές με μια σειρά μεταλλάξεων για τον οργανισμό, που εκφράζονται όσον αφορά τη σχεδίαση με σταθερές τιμές για τις διάφορες παραμέτρους του μοντέλου. Η ιδέα είναι ότι αυτές οι μεταλλάξεις εξετάζουν παραλλαγές στο μοντέλο που βοηθούν να ελέγξουμε ότι όλα τα κομμάτια είναι σωστά.

Μόλις διευκρινιστεί εντελώς το μοντέλο (συμπεριλαμβανομένων των αντιδράσεων, των νόμων ποσοστού, των παραμέτρων, των αρχικών τιμών, κ.λπ. για τον αναφερόμενο οργανισμό και όλων των μεταλλάξεων), ο χρήστης θα θέλει χαρακτηριστικά να τρέξει τις προσομοιώσεις για να εξετάσει πόσο καλά το μοντέλο ανταποκρίνεται στις προσδοκίες. Το απλούστερο πράγμα που μπορεί να γίνει είναι να τρεχτεί μια μόνο προσομοίωση για μια μόνο παραλλαγή του οργανισμού.

Εάν το μοντέλο εμφανιστεί "λογικό" στο σχεδιαστή, για τρεξίματα σε μεμονωμένες μεταλλάξεις, ο σχεδιαστής θα θελήσει σύντομα έναν τρόπο να μετρηθεί η απόδοση του γενικού μοντέλου όσον αφορά τη δυνατότητά του να ταιριάζει με τα πειραματικά στοιχεία για ολόκληρο το σύνολο των μεταλλάξεων. Για να γίνει μια σύγκριση, ο χρήστης πρέπει να καθορίσει τις σχέσεις μεταξύ των πειραματικών στοιχείων και της παραγωγής προσομοίωσης, συμπεριλαμβανομένου του καθορισμού μιας "καλής αντιστοιχίας". Μετά από τη μελέτη της ανάδρασης από το συγκριτή, ο χρήστης μπορεί έπειτα να κάνει τις αλλαγές στις διάφορες τιμές παραμέτρου. Αφού θα τρέξει το σύνολο πάλι, ο χρήστης θα έχει μια συλλογή νέων αποτελεσμάτων.

Σε κάποιο σημείο, το σχεδιαστής θα είναι αρκετά βέβαιος για το μοντέλο έτσι ώστε θα θελήσει να ξέρει ποιο είναι το καλύτερο που αυτό το ιδιαίτερο σύνολο εξισώσεων αντίδρασης μπορεί να επιτύχει. Δηλαδή για αυτό το δεδομένο σύνολο εξισώσεων, ποιες ρυθμίσεις τιμών παραμέτρου θα παράγουν το "καλύτερο" αποτέλεσμα; Μόλις ο εκτιμητής παραμέτρου επιστρέψει τις καλύτερες δυνατές τιμές για αυτό το σύνολο εξισώσεων αντίδρασης, το επόμενο βήμα θα είναι ο σχεδιαστής να χρησιμοποιήσει τι έχει μάθει μέχρι τώρα για να δημιουργήσει ένα νέο μοντέλο [9].

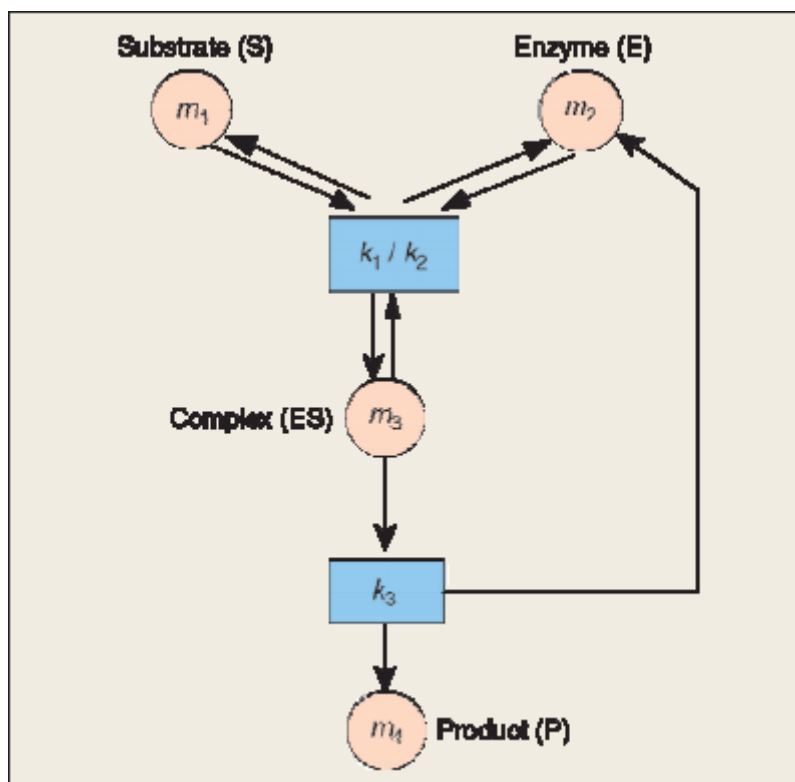
4.5.2 Παράδειγμα : Μοντελοποίηση του pathway μεταγωγής σήματος Ras/Raf-1/MEK/ERK [21]

Το μοντέλο Ras/Raf-1/MEK/ERK στο σχήμα 4.4 είναι ένα ευρέως διαδεδομένο signaling pathway που μεταβιβάζει μιτογενή σήματα και σήματα διαφοροποίησης από τη μεμβράνη των κυττάρων στον πυρήνα. Αυτή η ακολουθία κινήσεων εμφανίζεται να είναι χωρικά οργανωμένη σε ένα σύμπλεγμα σημάτων με πυρήνα από Ras πρωτεΐνες.

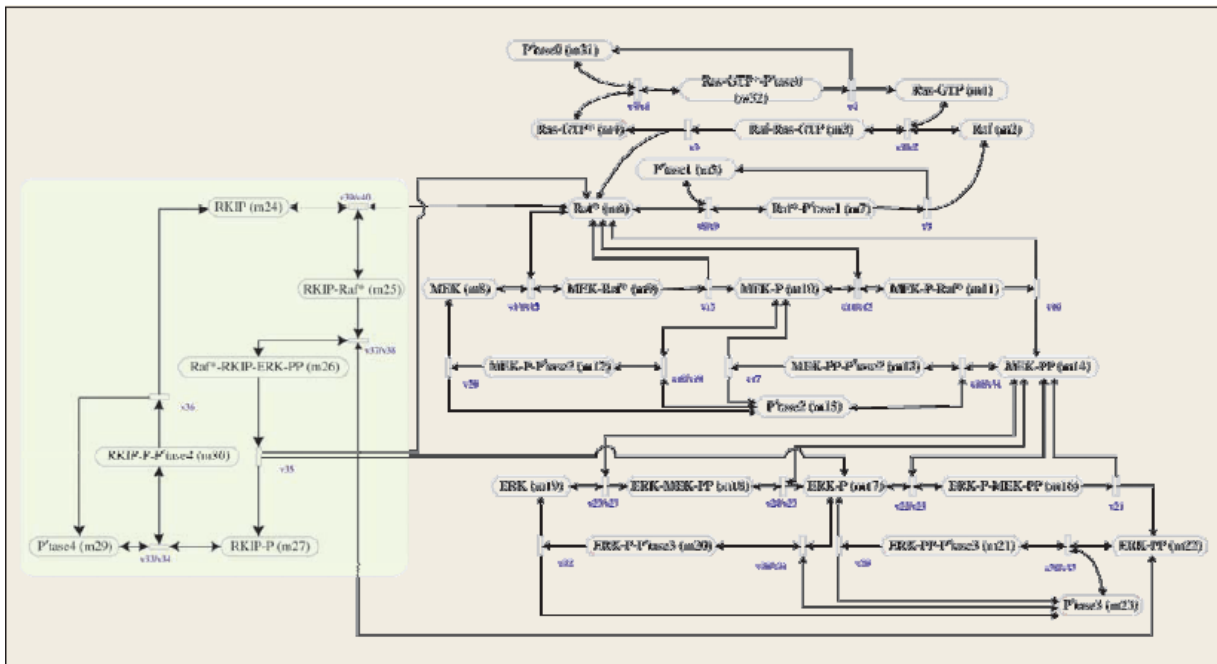
βιολογική μελέτη των συστημάτων. Τα σχήματα 4.5 και 4.6 περιγράφουν τα "διαγράμματα κυκλωμάτων" των βιοκινητικών αντιδράσεων για τις οποίες ένα μαθηματικό μοντέλο χρησιμοποιείται για να προσομοιωθεί η επιρροή των παραλλαγών στο pathway



Τα pathways μεταγωγής σημάτων μπορούν να αναπαρασταθούν ως αλληλουχίες από ενζυμικές αντιδράσεις κινηματικής που μετατρέπουν ένα υπόστρωμα S σε ένα προϊόν P μέσω ενός ενδιάμεσου σύμπλοκου SE και ρυθμιζόμενες από ένα ένζυμο E. Η ταχύτητα με την οποία η σύνθεση ένζυμο-υπόστρωμα SE σχηματίζεται συμβολίζεται με k_1 . Η σύνθεση SE έχει δύο πιθανές εκβάσεις στο επόμενο βήμα. Μπορεί να διαχωριστεί στο E και το S με ένα σταθερό ποσοστό k_2 ή μπορεί να προχωρήσει περαιτέρω και να σχηματιστεί ένα προϊόν P με μια σταθερά ποσοστού k_3 . Πρέπει να εκφραστούν οι σχέσεις μεταξύ του ποσοστού κατάλυσης και της αλλαγής της συγκέντρωσης για το υπόστρωμα, το ένζυμο, το σύμπλοκο, και το προϊόν. Με βάση αυτές τις κινηματικές αντιδράσεις, εξετάσαμε πρώτα έναν βασικό μπλοκ διαμόρφωσης των pathways μεταγωγής σημάτων.



Σχήμα 4.5: Βασικό μπλοκ μοντελοποίησης των pathways. Το μοντέλο του pathway είναι κατασκευασμένο από βασικές αντιδράσεις όπως αυτή η αντίδραση κινητικού ενζύμου για την οποία απαιτείται ένα σύνολο τεσσάρων διαφορετικών εξισώσεων, από [21].



Σχήμα 4.6: Γραφική αναπαράσταση του pathway μεταγωγής σημάτων Ras/Raf-1/MEK/ERK (το σκιασμένο μέρος αντιπροσωπεύει καταστολή από το RKIP): ο κύκλος αντιπροσωπεύει μία κατάσταση για τη συγκέντρωση μιας πρωτεΐνης και μία κάθετος μια κινητική παράμετρο της αντίδρασης που είναι να υπολογιστεί. Το κατευθυνόμενο τόξο (βέλη) που συνδέει έναν κύκλο και μία κάθετο αντιπροσωπεύει μια κατεύθυνση μιας ροής σημάτων. Τα αμφίδρομα παχιά βέλη αντιπροσωπεύουν ένα ποσοστό ένωσης και διαχωρισμού συγχρόνως. Τα λεπτά ομοιοκατευθυνόμενα βέλη αντιπροσωπεύουν ένα ποσοστό παραγωγής προϊόντων, από [21].

Αυτό το βασικό μπλοκ μοντελοποίησης παρουσιάζεται στο σχήμα 4.5 και μπορεί να περιγραφεί από το ακόλουθο σετ από μη γραμμικές συνήθειες διαφορικές εξισώσεις:

$$\frac{dm_1(t)}{dt} = -k_1 m_1(t) m_2(t) + k_2 m_3(t) \quad (4.2)$$

$$\frac{dm_2(t)}{dt} = -k_1 m_1(t) m_2(t) + k_2 m_3(t) + k_3 m_3(t) \quad (4.3)$$

$$\frac{dm_3(t)}{dt} = k_1 m_1(t) m_2(t) - k_2 m_3(t) - k_3 m_3(t) \quad (4.4)$$

$$\frac{dm_4(t)}{dt} = k_3 m_3(t). \quad (4.5)$$

Από αυτές έχουμε:

$$m_2(t) + m_3(t) = C_1, \quad (4.6)$$

$$m_1(t) + m_3(t) + m_4(t) = C_2. \quad (4.7)$$

Ως εκ τούτου μπορούμε να περιγράψουμε τη βασική ενότητα αντίδρασης από δύο μη γραμμικές εξισώσεις υποκείμενες σε δύο αλγεβρικούς όρους.

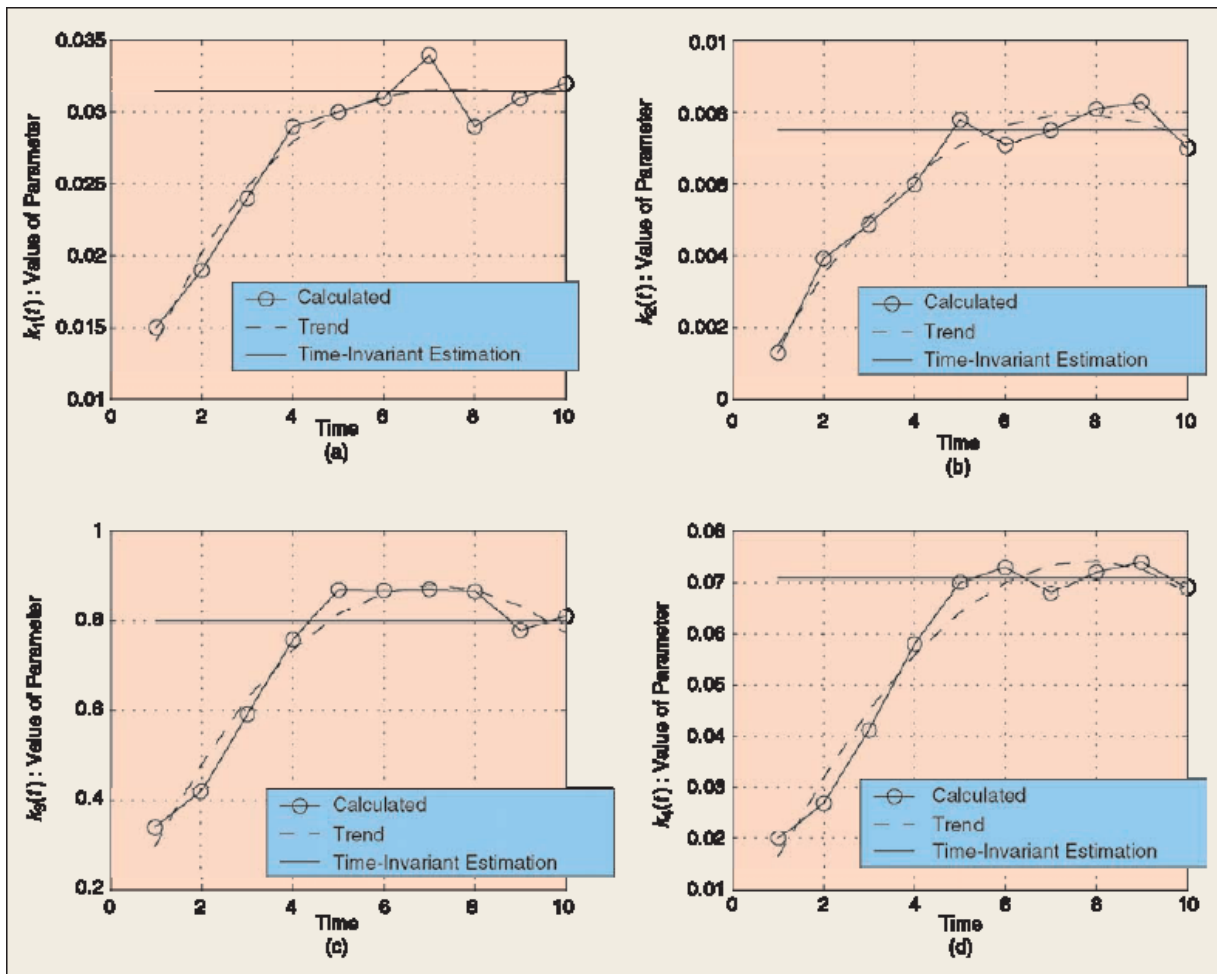
Γενικά, για ένα δεδομένο σύστημα μεταγωγής σημάτων, ολόκληρο το pathway μπορεί να διαμορφωθεί από ένα σύνολο μη γραμμικών διαφορικών εξισώσεων και από ένα σύνολο αλγεβρικών όρων στην εξής μορφή:

$$\frac{d\mathbf{m}(t)}{dt} = \mathbf{f}(\mathbf{m}(t), \mathbf{k}(t)), \quad (4.8)$$

$$\sum_{i \in \{1, p\}} m_i(t) = C_j,$$

όπου $\mathbf{m}(t) = [m_1(t), m_2(t), \dots, m_p(t)]$, $\mathbf{k}(t) = [k_1(t), k_2(t), \dots, k_p(t)]$, p είναι ο αριθμός των πρωτεϊνών που περιλαμβάνονται στο pathway, q είναι ο απαραίτητος αριθμός παραμέτρων, και $j \in \{1, \dots, J\}$ με τον αριθμό των αλγεβρικών όρων $J < p$.

Η εκτίμηση παραμέτρων θεωρείται ευρέως ως ένα σημαντικό πρόβλημα στη δυναμική μοντελοποίηση pathways. Μία απλή μέθοδος αρχικά μετασχηματίζει τις μη γραμμικές διαφορικές εξισώσεις σε αλγεβρικές εξισώσεις διαφοράς που είναι γραμμικές με σεβασμό στις παραμέτρους και μετά λύνει τις μετασχηματισμένες γραμμικές αλγεβρικές εξισώσεις διαφοράς για να λάβει τις τιμές των παραμέτρων σε κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας.



Σχήμα 4.7: Απεικόνιση της εκτίμησης παραμέτρου από δεδομένα μιας χρονικής σειράς: Κάθε παράμετρος καθορίζεται από την τιμή στην οποία συγκλίνουν οι εκτιμήσεις (απεικονίζεται με την οριζόντια γραμμή). (Σημειώστε ότι οποιοσδήποτε πειραματικός θόρυβος μπορεί να εξαλειφθεί περαιτέρω με τεχνικές παλινδρόμησης εάν πολλαπλές πειραματικές αντιγραφές είναι διαθέσιμες για κάθε χρονικό σημείο), από [21].

Μπορούμε έπειτα να υπολογίσουμε τις απαραίτητες τιμές παραμέτρου με τη χρησιμοποίηση της προσαρμογής καμπυλών (curve fitting), με τον υπολογισμό των τιμών σταθερής κατάστασης, και με τεχνικές εμπειρικής σχέσης μεταβλητών. Για αυτόν τον σκοπό της εκτίμησης παραμέτρου, οι προηγούμενες εξισώσεις μετασχηματίζονται σε :

$$\mathbf{k}(t) = \mathbf{g}\left(\mathbf{m}(t), \frac{d\mathbf{m}(t)}{dt}\right), \quad (4.8)$$

και αυτό μπορεί περαιτέρω να μετασχηματιστεί σε ένα σύνολο αλγεβρικών εξισώσεων διαφοράς προσεγγίζοντας το διάνυσμα διαφορικού τελεστή g μέσω ενός διανύσματος τελεστή διαφοράς h όπως

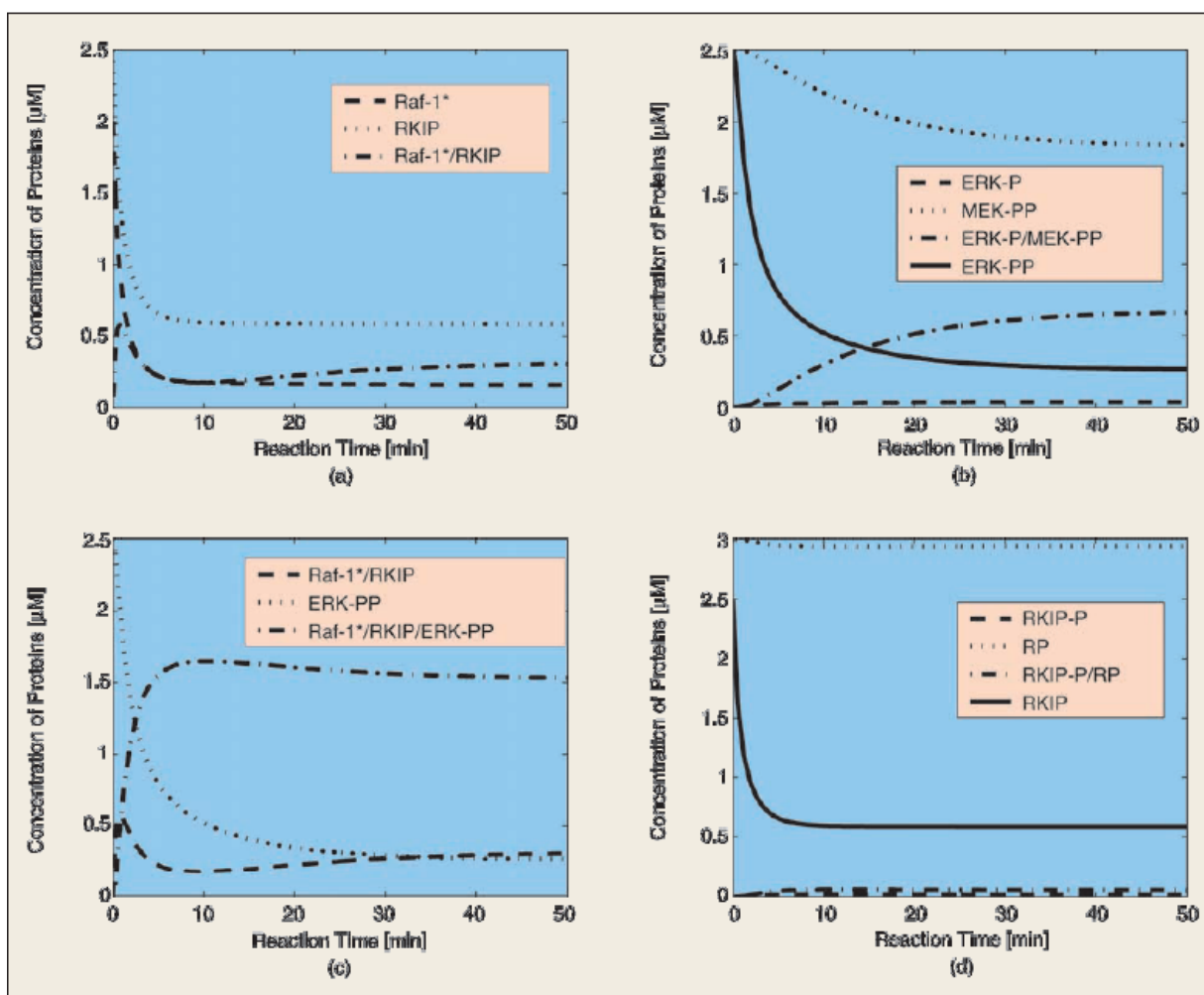
$$\mathbf{k}(t) \equiv \mathbf{h}(\mathbf{m}(t), \mathbf{m}(t-1), \dots, \mathbf{m}(t-r)) \quad (4.9)$$

όπου το r εξαρτάται από την τάξη της προσέγγισης. Χωρίς απώλεια της γενικότητας, το $\mathbf{k}(t)$ μπορεί να υπολογιστεί από το \mathbf{k} αφού τα περισσότερα από τα συστήματα μεταγωγής σημάτων μπορούν να θεωρηθούν ως αργά χρονικά μεταβαλλόμενα συστήματα (slowly time varying systems) συγκρινόμενα με την χρονική κλίμακα των παραθύρων μέτρησης. Ως εκ τούτου έχουμε

$$\mathbf{k} \equiv \mathbf{h}(\mathbf{m}(t), \mathbf{m}(t-1), \dots, \mathbf{m}(t-r)), \quad (4.10)$$

που υποδηλώνει τις εκτιμήσεις παραμέτρου που βασίζονται σε μετρήσεις χρονικής σειράς.

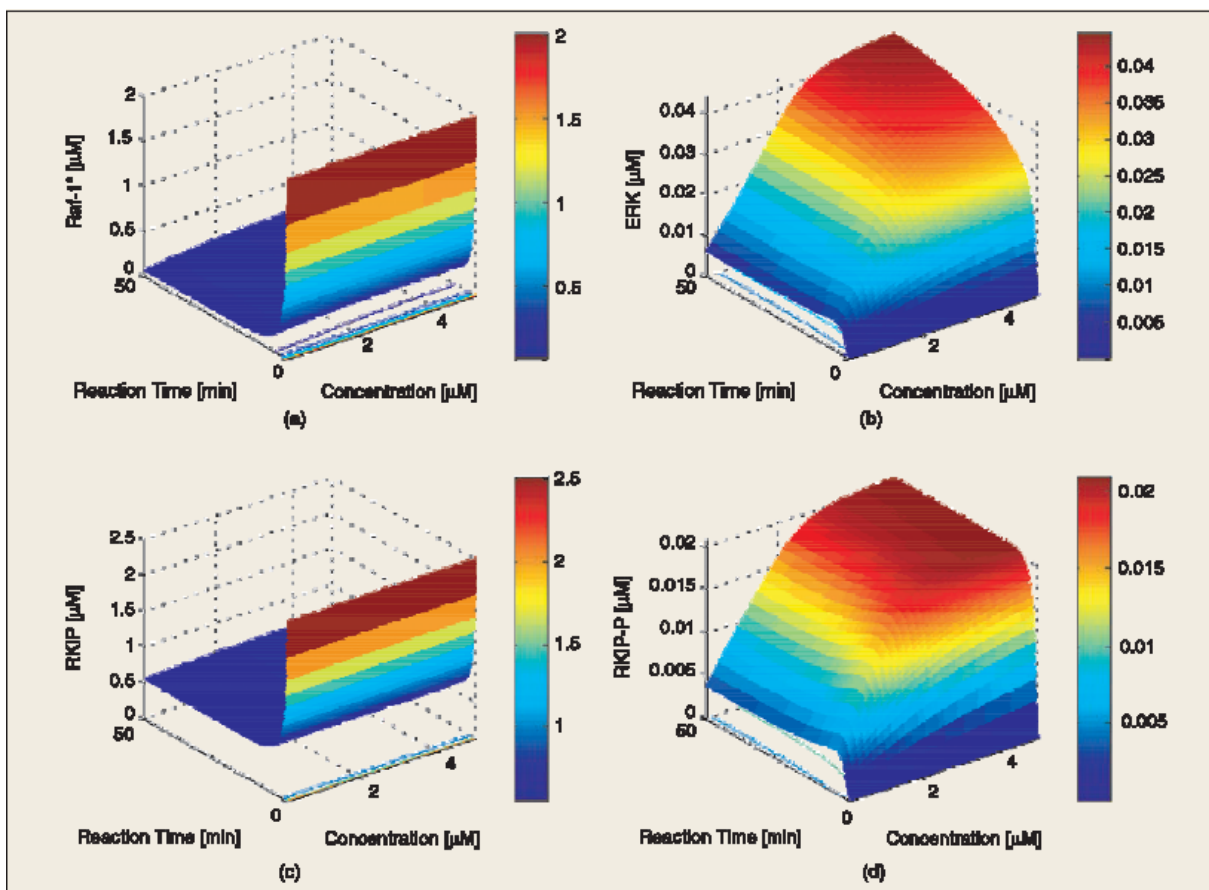
Ολόκληρο το μοντέλο, όπως φαίνεται στο σχήμα 4.6, κατασκευάζεται με αυτόν τον τρόπο και οδηγεί σε ένα μεγάλο σύνολο διαφορικών εξισώσεων για το οποίο οι τιμές των παραμέτρων πρέπει να προσδιοριστούν. Όπως διευκρινίζεται στο σχήμα 4.7, στην εκτίμηση παραμέτρων από δεδομένα κηλίδων western, οι εκτιμήσεις παραμέτρου συνήθως εμφανίζονται σαν μια χρονικά εξαρτώμενη κατανομή αφού τα δεδομένα χρονικής σειράς περιλαμβάνουν διάφορες αβεβαιότητες. Εντούτοις, αφού το ίδιο το σύστημα μεταγωγής σημάτων μπορεί να θεωρηθεί σαν χρονικά αμετάβλητο, η κατ' εκτίμηση κατανομή παραμέτρου πρέπει να συγκλίνει σε μια σταθερή τιμή στην σταθερή κατάσταση. Το σχήμα 4.7 επεξηγεί αυτήν την διαδικασία εκτίμησης.



Σχήμα 4.8 Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης για σταθερούς αρχικούς όρους: (α) παρουσιάζεται η πρόσδεση του RKIP στο Raf-1*, (β) παρουσιάζεται η πρόσδεση του MEK-PP To ERK-P, (γ) παρουσιάζεται η πρόσδεση του ERK-PP στο Raf-1*/RKIP, και (δ) παρουσιάζεται η πρόσδεση του RP στο RKIP-P, από [21].

Εάν ένα λογικό μοντέλο κατασκευάζεται, αυτό μπορεί έπειτα να είναι χρησιμοποιηθεί με ποικίλους τρόπους για να επικυρωθούν και να παραχθούν υποθέσεις, ή για να βοηθηθεί το πειραματικό σχέδιο. Με βάση το μαθηματικό μοντέλο που παρουσιάζεται στο σχήμα 4.6 και τις υπολογισμένες τιμές παραμέτρων όπως, παραδείγματος χάριν, λαμβάνονται χρησιμοποιώντας ένα μετασχηματισμό από μη γραμμικές συνήθειες διαφορικές εξισώσεις (όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 4.7), μπορούμε να εκτελέσουμε μελέτες προσομοίωσης για να επικυρωθεί ο μηχανισμός μεταγωγής σημάτων όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 4.5 και

επίσης να αναλύσουμε το σύστημα μεταγωγής σημάτων όσον αφορά την ευαισθησία για το συνδέτη (μέσω της προσομοίωσης των μεταβλητών αρχικών όρων) όπως παρουσιάζεται στο σχήμα 4.9 .



Σχήμα 4.9 : Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης για μεταβλητούς αρχικούς όρους: (α) παρουσιάζεται η μεταβολή του Raf-1*, (β) παρουσιάζεται η μεταβολή του ERK, (γ) παρουσιάζεται η μεταβολή του RKIP, και (δ) παρουσιάζεται η μεταβολή του RKIP-P, από [21].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ XENOPUS

5.1 ΓΙΑΤΙ Ο XENOPUS

5.1.1 Ιστορία

Η ιστορία της πειραματικής εμβρυολογίας ξεκινά από τα 1880, όταν ο Γερμανός εμβρυολόγος Wilhelm Roux κατέστρεψε ένα κύτταρο ενός εμβρύου βατράχου δύο-κυττάρων. Τα δύο έμβρυα που προέκυψαν έδειξαν ότι τα δύο κύτταρα είχαν διαφορετικές μοίρες. Οι Γερμανοί επιστήμονες ήταν οι αναμφισβήτητοι παγκόσμιοι εμπειρογνώμονες στην εμβρυολογία σε αυτά τα πρώτα χρόνια, χρησιμοποιώντας σαλαμάνδρες, βατράχους και αχινούς. Μερικές θεμελιώδεις ιδέες στην ανάπτυξη προέκυψαν, ειδικότερα η επίδειξη "της επαγωγής" του Hans Spemann. Έδειξε ότι ο ιστός που έρχεται σε επαφή με την αναπτυσσόμενη υποδοχή ματιών, προκλήθηκε για να διαμορφώσει το φακό του ματιού. Στο πείραμά του "διοργανωτής" το 1924, έδειξε ότι εάν ένα συγκεκριμένο κομμάτι ιστού κινηθεί από μια πλευρά του εμβρύου σε άλλη, ένας πλήρης δεύτερος άξονας σωμάτων θα μπορούσε να προκληθεί.

Ακόμα, η εμβρυολογική έρευνα πριν από τον Δεύτερο Παγκόσμιο Πόλεμο παρακωλύθηκε από μια έλλειψη αυγών, η οποία έπρεπε να συλλεχθεί από την ύπαιθρο. "Την άνοιξη, οι ερευνητές θα πήγαιναν και θα έβρισκαν βατράχους ή σαλαμάνδρες, να πάρουν τα αυγά τους και να κάνουν πολύ γρήγορα τα πειράματα για μερικές εβδομάδες," λέει ο καθηγητής Slack. "Θα περνούσαν έπειτα το υπόλοιπο του έτους μελετώντας τα αποτελέσματα."

Ο *Xenopus laevis* επρόκειτο να ο λυτρωτής των επιστημόνων, αλλά ανήλθε στην επιφάνεια για έναν άλλο λόγο συνολικά [22]. Στη δεκαετία του '30, ανακαλύφθηκε ότι ένα θηλυκό *Xenopus* αποκρίνεται σε μια ορμόνη παρούσα στα ούρα εγκύων γυναικών (χοριονική γοναδοτροπίνη) με τη γέννηση των αυγών. Οι βιολόγοι χρησιμοποιούν την ίδια μέθοδο για να προτρέψουν τους θηλυκούς βατράχους να παράγουν αυγά μετά από απαίτηση στο

εργαστήριο. Οι βάτραχοι έπειτα ξεκουράζονται για μερικούς μήνες, κατόπιν προκαλούνται πάλι (μέχρι τρεις φορές ετησίως). Πολύ λίγα είδη βατράχου μπορούν να προκληθούν για να παράγουν αυγά με έναν τέτοιο ελεγχόμενο τρόπο, και αυτό είναι ένας από τους λόγους για τους οποίους ο *Xenopus* είναι τόσο δημοφιλής με τους αναπτυξιακούς και κυτταρικούς βιολόγους [24]. Για ένα διάστημα στη δεκαετία του '40 και του '50, αυτό ήταν η μόνη διαθέσιμη εξέταση εγκυμοσύνης, και πολλά νοσοκομεία κράτησαν τον *Xenopus*. Δεν ήταν όλοι προσεκτικοί στην κράτηση των βατράχων, εντούτοις - "είναι πολύ καλοί στη διαφυγή!" λέει ο καθηγητής Slack. Διάφοροι άγριοι πληθυσμοί βρέθηκαν στην Καλιφόρνια, τη Νότια Αμερική και σε πιο κρύα μέρη, στην Νότια Ουαλία κοντά στο Σουόνση.

"Το τεστ εγκυμοσύνης συνήθισε τους ανθρώπους στην ιδέα ότι θα μπορούσες να πάρεις αυγά όποτε τα θελήσεις," λέει ο καθηγητής Slack. "Χρησιμοποιούμε ακόμα την ανθρώπινη χοριονική γοναδοτροπίνη για να προκαλέσουμε την ωογένεση, και μπορούμε να πάρουμε πολλά αυγά, καθ' όλη τη διάρκεια του έτους." Συνδεδεμένα με τη σκληραγωγημένη και γερή φύση των βατράχων, που τους καθιστά εύκολους να κρατηθούν, ο *Xenopus laevis* έχει αποδειχθεί ένα ιδανικό μοντέλο οργανισμού.

Από τη δεκαετία του '50 και μετά ο *Xenopus* γίνεται βαθμιαία ο επιλεγμένος οργανισμός για τις αναπτυξιακές μελέτες. "Μόλις αρχίζεις να κάνεις μοριακά πράγματα - και στη δεκαετία του '80 η μοριακή βιολογία έγινε απαραίτητη για τη μελέτη της ανάπτυξης - πρέπει να συμφωνήσεις απολύτως σχετικά με ένα είδος," λέει ο καθηγητής Slack. "Χρειάζεσαι τυποποιημένα αντιδραστήρια και τα πρωτόκολλα, και να συγκεντρώσεις τη γνώση· το να έχεις περισσότερα από ένα αμφίβια που μελετώνται θα εξασθένιζε την προσπάθεια."

Τα τελευταία χρόνια, ένας στενός ξάδελφος των *X. laevis*, ο *Xenopus tropicalis*, έχει εισαχθεί επίσης στην αναπτυξιακή διαμάχη. Ο *tropicalis* είναι μικρότερος από τον *laevis*, έχει έναν πιο σύντομο κύκλο ζωής (ωριμάζει σε περίπου έξι μήνες), και έχει ένα μικρό διπλοειδές γονιδίωμα. Υπάρχουν ελπίδες ότι ο *tropicalis* θα έχει όλα τα πλεονεκτήματα του *laevis* και της γενετικής επίσης. Όμως, ο *Xenopus tropicalis* είναι δυσκολότερο να κρατηθεί για να γίνουν τα πειράματα [22].

5.1.2 Ο *Xenopus*

Δύο είδη *Xenopus* χρησιμοποιούνται συνήθως από τους βιολόγους, ο *Xenopus laevis* και ο *Xenopus tropicalis*. Και τα δύο είδη *Xenopus* κατάγονται από την Αφρική. Τα *Xenopus laevis* έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλά έτη για να ερευνήσουν την πρόωρη περίοδο εμβρυϊκής ανάπτυξης. Τα έμβρυα αναπτύσσονται πολύ γρήγορα μετά από τη γονιμοποίηση, και ένας γυρίνος με ένα πλήρως λειτουργικό σύνολο οργάνων αναπτύσσεται μέσα σε μερικές ημέρες. Αυτό σημαίνει ότι ο βιολόγος μπορεί να πειραματιστεί στα έμβρυα άμεσα μετά από τη γονιμοποίηση, να αφήσει τα έμβρυα να αναπτυχθούν σε ένα απλό αλατούχο διάλυμα για μερικές ημέρες, κατόπιν να εξετάσει τους γυρίνους για να καθορίσει εάν η πειραματική επέμβαση είχε οποιαδήποτε επίδραση. Ο ρόλος των γονιδίων στην ανάπτυξη μπορεί να δοκιμαστεί με την έγχυση ενός μικροσκοπικού ποσού ενός mRNA κωδικοποιώντας το γονίδιο ενδιαφέροντος σε ένα πρόωρο έμβρυο, κατόπιν επιτρέποντας πάλι στο έμβρυο να αναπτυχθεί σε γυρίνο.

Ο αφρικανικός βάτραχος *Xenopus laevis* είναι ίσως το πιο γνωστό για τα 14 είδη *xenopi*, τα οποία έχουν ένα σώμα με γωνίες, ίσιο από την πλάτη μέχρι την κοιλιά, και μικρά μάτια που κοιτάζουν προς τα πάνω. Ο όρος *Xenopus* είναι λατινικός και σημαίνει "παράξενο πόδι", μια κατάλληλη περιγραφή για τα χαρακτηριστικά πόδια αυτής της ομάδας το οποίο είναι τεράστιο, ενωμένο με μεμβράνη, έχει πέντε δάκτυλα και στο πίσω μέρος του ποδιού έχει τρία νύχια. Το *Laevis* σημαίνει ομαλός, λείος. Όλα τα *xenopi* είναι πλήρως υδρόβια. Όλοι είναι εγγενείς μόνο στην νότια Σαχάρα της Αφρικής, όπου είναι συνήθως γνωστοί ως *Platannas*. Τα θηλυκά *Xenopus laevis* έχουν περίπου 10cm μήκος και είναι παχουλά, τα αρσενικά έχουν το μισό μέγεθος και είναι αδύνατα. Σε αιχμαλωσία οι βάτραχοι μπορούν να ζήσουν για 15 έτη. Επιπλέον τα *Xenopus laevis* έχουν ταξιδέψει αρκετές φορές σε διαστημικό λεωφορείο.

Αν και η εμβρυολογία έχει αποδειχθεί ο κύριος κλάδος που χρησιμοποιείται ο *Xenopus*, πολλοί άλλοι τομείς έχουν ωφεληθεί. Εδώ είναι μερικά κυριότερα σημεία.

α) Κλωνοποίηση. Το 1952, οι Robert Briggs και Thomas J King κλωνοποίησαν τους βόρειους leopard βατράχους χρησιμοποιώντας μια μέθοδο πυρηνικής μεταφοράς. Το πείραμα Briggs και King ήταν παρόμοιο με αυτό που προβλέφθηκε - και καθοδηγούμενοι χρησιμοποιώντας σαλαμάνδρες - από τον Hans Spemann στην πρότασή του το 1938 για ένα 'φανταστικό

πείραμα'. Αργότερα, ο John Gurdon επέκτεινε αυτήν την εργασία και έδειξε ότι οι πυρήνες από διαφοροποιημένα κύτταρα θα μπορούσαν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη, αν και λιγότερο καλά από εκείνους από πρόωρα έμβρυα.

β) Επαλήθευση του αγγελιοφόρου RNA. Ενώ η ύπαρξη και ο ρόλος του αγγελιοφόρου RNA (mRNA) ήταν γνωστές στα βακτηρίδια, στη δεκαετία του '60 ακόμα συζητήθηκε εάν υπήρξε επίσης στα σπονδυλωτά. Παίρνοντας την αιμογλοβίνη mRNA από τα ανώριμα κόκκινα κύτταρα αίματος και εγχέοντας την σε ένα ωοκύτταρο *Xenopus*, ο John Gurdon έδειξε ότι η πρωτεΐνη αιμογλοβίνης παρήχθη πράγματι. Η παραγωγή των πρωτεϊνών στα ωοκύτταρα *Xenopus* έχει αποδειχθεί εξαιρετικά χρήσιμη στη βιολογία κυττάρων, ειδικότερα για τη μελέτη των πρωτεϊνών δεκτών.

γ) Cell cycle. Δεδομένου ότι αναπτύσσονται έξω από τη μητέρα, τα αυγά βατράχων εφοδιάζονται καλά με τις πρωτεΐνες που απαιτούνται για να οδηγήσουν στην ανάπτυξη του εμβρύου. Οι μελέτες αυτών των διεργασιών έχουν ρίξει το ιδιαίτερο φως στις διεργασίες που περιλαμβάνονται στην κυτταροδιαίρεση – που κλείνει τον κύκλο κυττάρων [22].

5.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΚΑΙ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ *XENOPUS*

5.2.1 Βιολογικό υπόβαθρο

5.2.1.1 Πρόωρη Εμβρυογένεση στους βατράχους

Αμέσως μετά τη γονιμοποίηση, ένα αυγό βατράχου εκτελεί 12 γρήγορες σύγχρονες, αυτόνομες κυτταροδιαιρέσεις (η σύνθεση DNA ακολουθείται από τη μίτωση και το χωρισμό κυττάρων) για να γίνει μια κοίλη σφαίρα κυττάρων, αποκαλούμενη βλαστίδιο (blastula), το οποίο έπειτα υποβάλλεται σε σύνθετες δομικές ρυθμίσεις που δημιουργούν τελικά ένα αμφίβιο-κάμπια. Οι κυτταροδιαιρέσεις προκαλούνται από τον παράγοντα προώθησης της Μ-φάσης (MPF), μια πρωτεϊνική κινάση που αποτελείται από δύο υπομονάδες: τη Cdc2 (η καταλυτική υπομονάδα) και την κυκλίνη B (η ρυθμιστική υπομονάδα). Όταν ενεργοποιείται, ο MPF φωσφοροποιεί μια σειρά πρωτεϊνών που εμπλέκονται στη συμπύκνωση χρωμοσωμάτων, στη διάσπαση του πυρηνικού τοιχώματος, στο σχηματισμό των αξόνων και σε άλλα γεγονότα που οδηγούν στη μίτωση. Όσο τα κύτταρα βγαίνουν από τη μίτωση, η δραστηριότητα MPF

μειώνεται και το DNA μπορεί να αντιγραφεί και ο χωρισμός κυττάρων μπορεί να αρχίσει. Κατά συνέπεια, κατά τη διάρκεια της πρόωρης εμβρυογένεσης, η εναλλαγή των φάσεων S και M και του χωρισμού κυττάρων ελέγχεται από χρονικές διακυμάνσεις της δραστηριότητας MPF [10].

5.2.1.2 Γιατί εκχύλισμα αυγών βατράχων;

Το εκχύλισμα χωρίς κύτταρα των αυγών βατράχων που προετοιμάζεται με τη μέθοδο των Murray και Kirschner (1989), εκθέτει πολλές ιδιότητες ενός άθικτου αυγού, συμπεριλαμβανομένης της περιοδικής ενεργοποίησης του MPF. Δεδομένου ότι ένα εκχύλισμα χωρίς κύτταρα είναι ευκολότερο στη χρήση και στον έλεγχο από το άθικτο αυγό, χρησιμοποιείται για να μελετηθούν οι μοριακές λεπτομέρειες για την ενεργοποίηση του MPF [10].

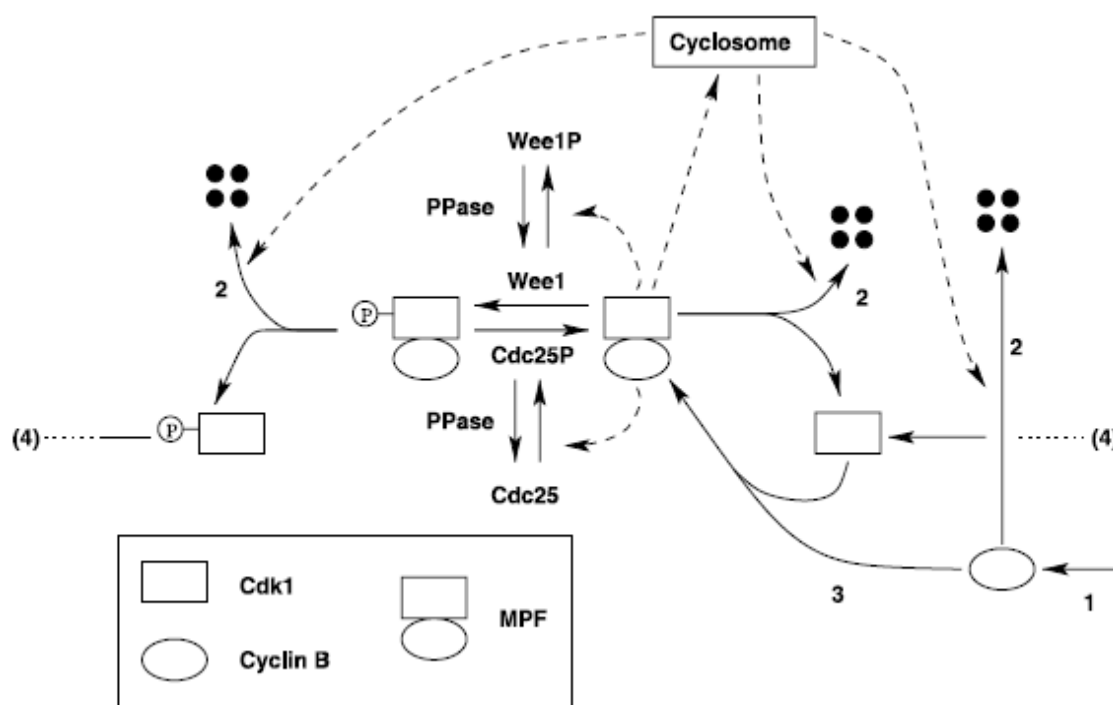
5.2.1.3 Μηχανισμός της ρύθμισης του MPF

Υπάρχουν δύο αρχικοί τρόποι ρύθμισης της δραστηριότητας MPF στα αυγά βατράχων:

- Αν και η καταλυτική υπομονάδα Cdc2 είναι παρούσα σε σταθερά επίπεδα σε όλα τα αρχικά αναπτυξιακά στάδια, ο συνεργάτης της, κυκλίνη B, κυμαίνεται κάθε κύκλο λόγω των αλλαγών στο ποσοστό διάσπασής του, που πραγματοποιείται από ένα σύμπλεγμα ενζύμων, αποκαλούμενο APC (σύμπλεγμα προαγωγής ανάφασης) ή κυκλώσωμα (cyclosome). Δεδομένου ότι το Cdc2 είναι καταλυτικά ενεργό μόνο όταν δεσμεύεται με την κυκλίνη B, η δραστηριότητα MPF έρχεται και πηγαίνει με φάσεις σύνθεσης και διάσπασης κυκλίνης σε κάθε κύκλο.
- Η δραστηριότητα MPF μπορεί επίσης να τροποποιηθεί από τη φωσφοροποίηση της υπομονάδας Cdc2. Για να είναι καταλυτικά ενεργό, το Cdc2 πρέπει να είναι φωσφοροποιημένο σε ένα συγκεκριμένο αμινοξύ (θρεονίνη στη θέση 167) και μην είναι φωσφοροποιημένο σε ένα διαφορετικό αμινοξύ (τυροσίνη στη θέση 15). Η ενεργή φωσφοροποίηση σε Thr-167 πραγματοποιείται από το ένζυμο CAK, το οποίο είναι δομικά ενεργό, μη υπαγόμενο σε ρύθμιση, έτσι το αγνοούμε στο μοντέλο. Η

ανασταλτική φωσφοροποίηση σε Tyr-15 πραγματοποιείται από μια κινάση που καλείται Wee1, και η αντίστροφη αντίδραση από μια φωσφατάση αποκαλούμενη Cdc25.

Επειδή ο MPF μπορεί να έχει επιπτώσεις στα ένζυμα που ελέγχουν τη δραστηριότητά του, υπάρχουν μηχανισμοί ανάδρασης σε αυτό το ρυθμιστικό δίκτυο όπως φαίνεται στο διάγραμμα καλωδίωσης κατωτέρω. Ο MPF μπορεί να ενεργοποιήσει τον μηχανισμό διάσπασής του APC/κυκλώσωμα έμμεσα μέσω ενός ενδιάμεσου βήματος (IE), δημιουργώντας κατά συνέπεια ένα βρόχο αρνητικής ανάδρασης. Αφ' ετέρου, ο MPF μπορεί να εμποδίσει τον ανασταλτικό παράγοντά του Wee1 και ενεργοποιεί τον ενεργοποιητή του Cdc25, δημιουργώντας κατά συνέπεια δύο βρόχους θετικής ανάδρασης [10].

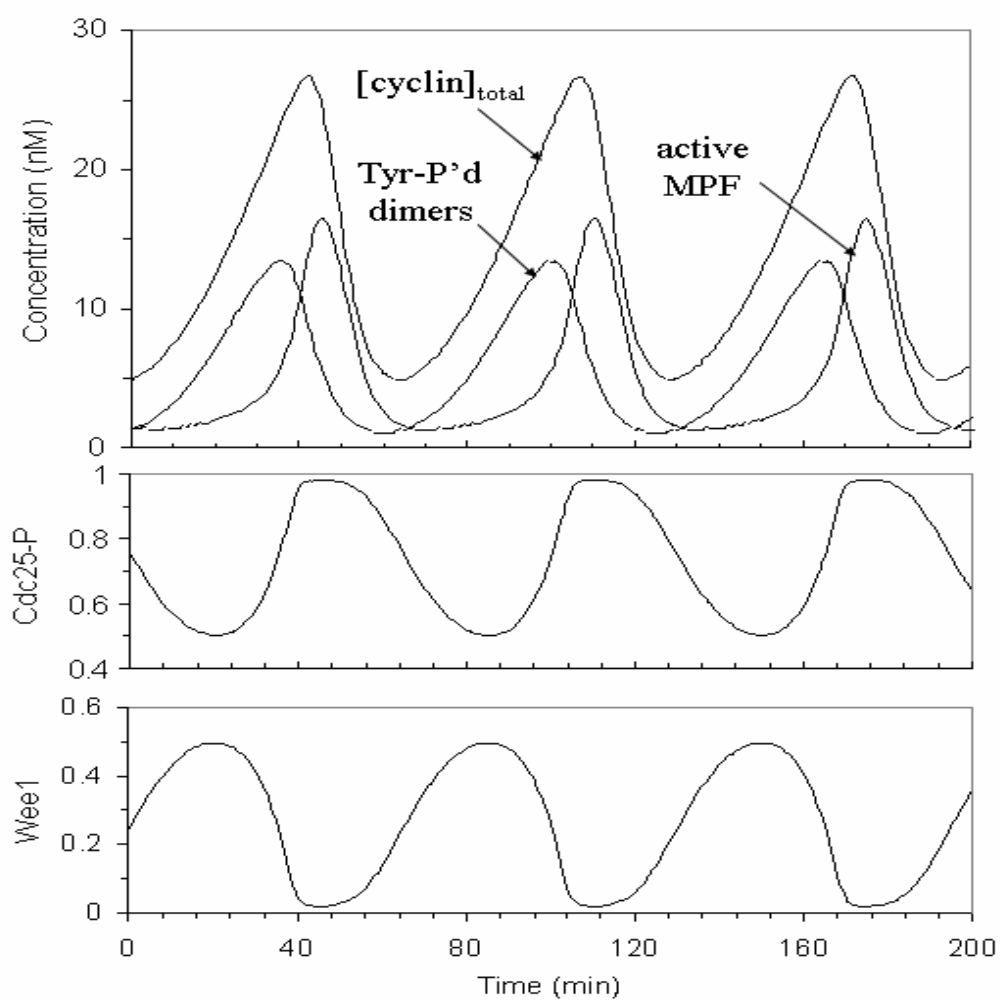


Σχήμα 5.1 Το βιοχημικό σύστημα ελέγχου για την ενεργοποίηση του MPF στα εκχυλίσματα αυγών βατράχων. MPF (παράγοντας προαγωγής μίτωσης - διμερές μιας κινάσης εξαρτώμενης-κυκλίνης, Cdk1 (ορθογώνιο), και μιας B-type κυκλίνης (ωοειδές). Η αυξανόμενη δραστηριότητα MPF οδηγεί ένα εκχύλισμα στη σύνθεση DNA, στην αποσύνθεση της πυρηνικής μεμβράνης, στη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και στην ευθυγράμμιση των αντιγραμμένων χρωμοσωμάτων στον άξονα της μίτωσης. Η μειωμένη δραστηριότητα MPF επιτρέπει το διαχωρισμό των αδελφών χρωματίδων, την πυρηνική επανασυναρμολόγηση και επιτρέπει στο DNA άλλο έναν κύκλο αντιγραφής. Οι κύκλοι της ενεργοποίησης MPF και της

αδρανοποίησης οδηγούνται από φάσεις σύνθεσης και διάσπασης της κυκλίνης και από φάσεις Cdk1 φωσφοροποίησης (από Wee1) και αποφωσφοροποίησης (από Cdc25). Το πρόσφατα γονιμοποιημένο αυγό έχει έναν μεγάλο απόθεμα Cdk1, των ενζύμων Wee1 και Cdc25, και κυκλοσωμάτων (τα πρωτεϊνικά συγκροτήματα που προωθούν την διάσπαση κυκλίνης B στα βήματα επονομαζόμενα 2). Το μόνο ελλειπές συστατικό είναι η κυκλίνη B. Όσο η κυκλίνη συντίθεται (το βήμα 1), ενώνεται γρήγορα (βήμα 3) με μονομερή Cdk1 για να σχηματίσει ενεργά διμερή MPF. Τα ενεργά διμερή, εντούτοις, φωσφοροποιούνται γρήγορα από Wee1 σε μια λιγότερο ενεργό μορφή. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης του κύκλου, οι κυκλίνες είναι σχετικά σταθερές επειδή το κυκλώσωμα είναι ανενεργό. Για να εισαχθεί το εκχύλισμα στη μίτωση, οι ανασταλτικές ομάδες φωσφορικού άλατος πρέπει να αφαιρεθούν από το Cdk1 μέσω του Cdc25. Η ενεργοποίηση του MPF είναι μια αυτοκαταλυτική διαδικασία επειδή ο ενεργός MPF ενεργοποιεί το Cdc25 και εμποδίζει το Wee1 (PPase είναι μια φωσφατάση που αντιτάσσει το MPF σε αυτές τις αντιδράσεις). Όσο η δραστηριότητα του MPF αυξάνεται, οι πυρήνες οδηγούνται σε μίτωση και τα κυκλοσώματα ενεργοποιούνται. Τα κυκλοσώματα προωθούν τη γρήγορη διάσπαση της κυκλίνης, η οποία καταστρέφει τη δραστηριότητα του MPF και επιτρέπει στους πυρήνες να τελειώσουν τη μίτωση και να προετοιμαστούν για έναν νέο κύκλο αντιγραφής του DNA, από [26].

5.2.1.4 Αυτόνομη ταλάντωση της δραστηριότητας MPF

Στο εκχύλισμα αυγών, κατά τη διάρκεια της ενδιάμεσης φάσης, όσο οι κυκλίνες συντίθενται εκ νέου, δεσμεύονται γρήγορα από την άφθονη Cdc2 υπομονάδα για να διαμορφώσουν το μη φωσφοροποιημένο διμερές, το οποίο έπειτα μετατρέπεται γρήγορα συνήθως στην ανενεργό, φωσφοροποιημένη μορφή (με ένα μικρό μέρος στην ενεργό μορφή), επειδή το Wee1 είναι ενεργό, και το Cdc25 ανενεργό. Όσο περισσότερες κυκλίνες γίνονται, τόσο περισσότερος ανενεργός MPF (στην ίδια αναλογία, έναν πιο μικρό ενεργό MPF) διαμορφώνεται. Όταν αρκετή ενεργός μορφή συσσωρευτεί πάνω από το κατώτατο όριο για να προκαλέσει τους βρόχους θετικής ανάδρασης, εμφανίζεται μια απότομη μετάβαση από την ενδιάμεση φάση στη μίτωση. Ο φωσφοροποιημένος ανενεργός MPF μετατρέπεται απότομα στην ενεργό μορφή καθώς το Wee1 αδρανοποιείται και το Cdc25 ενεργοποιείται. Όταν ο MPF ενεργοποιείται, ανοίγει το μηχανισμό διάσπασης APC/κυκλώσωμα, αναγκάζοντας την κυκλίνη B να εξαφανιστεί. Το σύστημα ελέγχου πηγαίνει μετά πίσω στην ενδιάμεση φάση με χαμηλή δραστηριότητα MPF, και ο κύκλος επαναλαμβάνεται [10].

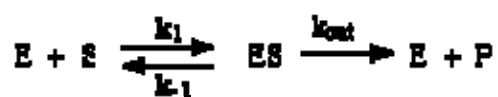


Σχήμα 5.2 Αυτόνομη ταλάντωση της δραστηριότητας MPF, από [10].

5.2.2 Μαθηματικό υπόβαθρο

5.2.2.1 Η εξίσωση των Michaelis-Menten

Έστω ένα απλό μοντέλο ενζυμικής δράσης:



(5.1)

Σε αυτό το μοντέλο, το υποστρώμα S ενώνεται σε πρώτη φάση αντιστρεπτά με το ένζυμο E, και μερικό από το προκύπτον σύμπλοκο ES διασπάται και παράγεται το προϊόν P και το ελεύθερο ένζυμο E. Θα επιθυμούσαμε να ξέρουμε πώς να αναγνωρίσουμε ένα ένζυμο που συμπεριφέρεται σύμφωνα με αυτό το μοντέλο. Ένας τρόπος είναι να εξετάσουμε την κινητική συμπεριφορά του ενζύμου· το πώς η συγκέντρωση του υποστρώματος επηρεάζει την ταχύτητά του. Έτσι θέλουμε να ξέρουμε σε ποιο νόμο ποσοστού θα υπάκουγε ένα τέτοιο ένζυμο. Εάν ένα πρόσφατα ανακαλυμμένο ένζυμο υπακούει εκείνο τον νόμο ποσοστού, κατόπιν μπορούμε να υποθέσουμε ότι ενεργεί σύμφωνα με αυτό το μοντέλο. Εξάγουμε έναν νόμο ποσοστού από αυτό το μοντέλο.

Σε αυτό το μοντέλο, το v_0 είναι η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης. Το τελευταίο αντιπροσωπεύει την εμφάνιση του προϊόντος P στη λύση ($+d[P] / dt$) της οποίας η φαινομενολογική εξίσωση ποσοστού (πρώτης τάξης) δίνεται από

$$v_0 = k_{cat} [ES] \quad (5.2)$$

περιέχοντας μια πειραματικά μετρήσιμη (εξαρτώμενη) μεταβλητή v_0 , μια κινητική παράμετρος k_{cat} , και μια άλλη μεταβλητή άγνωστη σε μας $[ES]$.

Πριν προχωρήσουμε, πρέπει να δηλώσουμε (και να θυμηθούμε) μερικές υποθέσεις:

- Εφ' όσον εξετάζεται η αρχική ταχύτητα, η συγκέντρωση του προϊόντος μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα (έναντι αυτής του υποστρώματος, κατά συνέπεια $[P] \ll [S]$), και
- Η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι σε πολύ μεγαλύτερη ποσότητα από αυτήν του ενζύμου ($[E] \ll [S]$).

Αυτές οι υποθέσεις, που ισχύουν στα περισσότερα κινητικά πειράματα που εκτελούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες σε χαμηλή ενζυμική συγκέντρωση, είναι κατάλληλες κατά την εξέταση των εξισώσεων μαζικής συντήρησης για τα αντιδραστήρια

$$[S]_0 = [S]_{free} + [ES] + [P] \text{ και τώρα έχουμε } [S]_0 = [S],$$

ενώ αυτή για το ένζυμο είναι

$$[E]_{total} = [E]_{free} + [ES] \text{ (ο πιθανός σχηματισμός ενός συμπλόκου EP δεν εξετάζεται εδώ)}$$

Θέλουμε να εκφράσουμε το v_0 από την άποψη των μετρήσιμων (πειραματικά καθορισμένων, ανεξάρτητων) μεταβλητών, όπως τα $[S]$ και $[E]_{\text{total}}$, έτσι μπορούμε να δούμε πώς να εξετάσουμε το μηχανισμό από πειράματα κινηματικής. Έτσι πρέπει να αντικαταστήσουμε την άγνωστη $[ES]$ στην Εξ. (5.2) με μετρήσεις.

Κατά τη διάρκεια της αρχικής φάσης της αντίδρασης, εφόσον η ταχύτητα αντίδρασης παραμένει σταθερή, η αντίδραση είναι σε μια σταθερή κατάσταση, με την ES να σχηματίζεται και να διασπάται με τον ίδιο ρυθμό. Κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης, ο ρυθμός σχηματισμού $[ES]$ είναι ίσος με το ρυθμό διάσπασής του. Σύμφωνα με το μοντέλο (5.1),

$$\text{Ρυθμός σχηματισμού του } [ES] = k_1 [E][S].$$

$$\text{Ρυθμός διάσπασης του } [ES] = k_{-1} [ES] + k_{\text{cat}} [ES].$$

Έτσι στην κατάσταση ισορροπίας θα έχουμε,

$$k_{-1} [ES] + k_{\text{cat}} [ES] = k_1 [E][S] \quad (5.3)$$

Θυμηθείτε ότι προσπαθούμε να λύσουμε ως προς $[ES]$, έτσι ώστε μπορούμε να το αντικαταστήσουμε στην Εξ. (5.2). Πρώτα, συλλέγουμε τις κινητικές σταθερές, και τις συγκεντρώσεις (μεταβλητές) στην Εξ. (5.3):

$$(k_{-1} + k_{\text{cat}}) [ES] = k_1 [E][S],$$

και

$$(k_{-1} + k_{\text{cat}}) / k_1 = [E][S] / [ES] \quad (5.4)$$

Για να απλοποιήσουμε την Εξ. (5.4), ομαδοποιούμε αρχικά τις κινητικές σταθερές με τον καθορισμό τους ως k_m :

$$k_m = (k_{-1} + k_{\text{cat}}) / k_1 \quad (5.5)$$

και έπειτα εκφράζουμε την $[E]$ συναρτήσει των $[ES]$ και $[E]_{\text{total}}$, για να περιορίσουμε τον αριθμό των αγνώστων:

$$[E] = [E]_{\text{total}} - [ES] \quad (5.6)$$

Αντικαθιστούμε τις Εξ. (5.5) και (5.6) στην Εξ. (5.4):

$$k_m = ([E]_{\text{total}} - [ES]) [S] / [ES] \quad (5.7)$$

Λύνουμε την Εξ. (5.7) ως προς [ES]:

Αρχικά πολλαπλασιάζουμε και τις δύο πλευρές με [ES] :

$$[ES] k_m = [E]_{\text{total}} [S] - [ES][S]$$

Κατόπιν συλλέγουμε τους όρους που περιέχουν [ES] στα αριστερά:

$$[ES] k_m + [ES][S] = [E]_{\text{total}} [S]$$

Υπολογίζουμε το [ES] από τους αριστερούς όρους:

$$[ES](k_m + [S]) = [E]_{\text{total}} [S]$$

και τελικά, διαιρούμε και τις δύο πλευρές με $(k_m + [S])$:

$$[ES] = [E]_{\text{total}} [S] / (k_m + [S]) \quad (5.8)$$

Αντικαθιστούμε την Εξ. (5.8) στην Εξ. (5.2):

$$v_0 = k_{\text{cat}} [E]_{\text{total}} [S] / (k_m + [S]) \quad (5.9)$$

Η μέγιστη ταχύτητα V_{max} εμφανίζεται όταν το ένζυμο είναι κορεσμένο, δηλαδή, όταν όλα τα ενζυμικά μόρια είναι συνδεδεμένα με το S, ή $[ES] = [E]_{\text{total}}$. Κατά συνέπεια,

$$V_{\text{max}} = k_{\text{cat}} [E]_{\text{total}} \quad (5.10)$$

Αντικαθιστούμε τη V_{\max} στην Εξ. (5.9) με $k_{\text{cat}} [E]_{\text{total}}$:

$$v_0 = V_{\max} [S] / (k_m + [S]) \quad (5.11)$$

Αυτή η εξίσωση εκφράζει το αρχικό ποσοστό αντίδρασης σε σχέση με μια μετρήσιμη ποσότητα, την αρχική συγκέντρωση υποστρώματος. Οι δύο κινητικές παράμετροι, το V_{\max} και το k_m , θα είναι διαφορετικές για κάθε ζευγάρι ένζυμο - υπόστρωμα.

Η εξίσωση (5.11), η εξίσωση Michaelis - Menten, περιγράφει την κινητική συμπεριφορά ενός ενζύμου που ενεργεί σύμφωνα με το απλό μοντέλο (5.1) Η εξίσωση (5.11) είναι της μορφής

$$y = ax / (b + x)$$

Αυτό είναι η εξίσωση μιας ορθογώνιας υπερβολής, ακριβώς όπως η εξίσωση κορεσμού για την πρόσδεση του οξυγόνου στην αιμογλοβίνη.

Από μαθηματική άποψη, η συνάρτηση v_0 παρουσιάζει δύο ασύμπτωτες:

- μία παράλληλη στον άξονα του $[S]$ στο $v_0 = V_{\max}$, αντιπροσωπεύει την ταχύτητα σε άπειρη $[S]$ (κορεσμός),
- η δεύτερη παράλληλη στον άξονα v_0 στο $[S] = -k_m$, δεν έχει καμία φυσική έννοια (καμία αρνητική συγκέντρωση).

Περαιτέρω ανάλυση αποκαλύπτει τη φυσική έννοια του k_m : η συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία η ταχύτητα είναι μισή του V_{\max} . Πράγματι, αντικαθιστώντας το k_m με το $[S]$ στην Εξ. (5.11) έχουμε:

$$v_0 = 1/2 V_{\max}$$

Κατά συνέπεια, μια χαμηλή τιμή για το k_m μπορεί να δείξει μια υψηλή σχέση του ενζύμου με το υπόστρωμά του. Ένα άλλο φυσικά σημαντικό όριο αυτής της συνάρτησης βρίσκεται σε μικρές τιμές $[S]$ ($\rightarrow 0$), όπου $v_0 \rightarrow V_{\max} / k_m [S]$.

Σε αυτήν την περίπτωση, η ταχύτητα γίνεται ανάλογη προς τη (χαμηλή, σχετική με την k_m) συγκέντρωση υποστρώματος. Η παράμετρος V_{\max} / k_m (ή μάλλον το σταθερό μέρος του k_{cat} / k_m), συχνά καλούμενο ως καταλυτική δυνατότητα του ενζύμου, είναι ένα άμεσο μέτρο της αποδοτικότητας του ενζύμου στο μετασχηματισμό του υποστρώματος S.

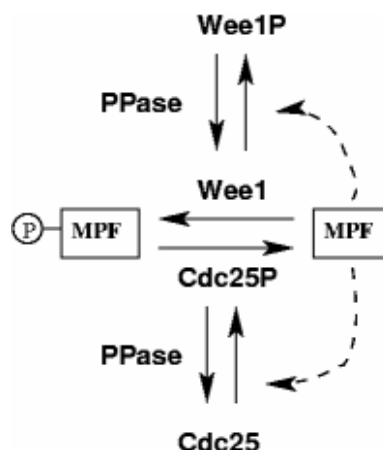
Το k_{cat} / k_m ανασυνδυάζει τις δύο παραδοσιακά-χωρισμένες πτυχές της ενζυμικής κατάλυσης:

- η αποτελεσματικότητα του μετασχηματισμού του συνδεδεμένου προϊόντος (κατάλυση αυτή καθ' εαυτή, k_{cat})
- η αποτελεσματικότητα της παραγωγικής σύνδεσης υποστρωμάτων (σχέση, $1/k_m = k_1 / (k_{-1} + k_{\text{cat}})$)

Η εξίσωση (5.11) σημαίνει ότι, για ένα ένζυμο που ενεργεί σύμφωνα με το απλό μοντέλο (5.1), μια γραφική παράσταση του v_0 με το $[S]$ θα είναι μία ορθογώνια υπερβολή. Όταν τα ένζυμα παρουσιάζουν αυτήν την κινητική συμπεριφορά, εκτός αν βρούμε άλλα στοιχεία στο αντίθετο, υποθέτουμε ότι ενεργούν σύμφωνα με το μοντέλο (5.1), και τα αποκαλούμε ένζυμα Michaelis – Menten [20].

5.3 TO MONTEΛΟ XENOPUS

Για να μελετήσει το μηχανισμό της ενεργοποίησης και της αδρανοποίησης του MPF με φωσφοροποίηση, ο Solomon [15] σχεδίασε ένα πείραμα, στο οποίο απέβαλε τη συμμετοχή της σύνθεσης και της διάσπασης κυκλίνης. Χρησιμοποίησε εκχύλισμα αυγών βατράχων που περιείχε κυκλοεξιμίδιο για να εμποδίσει τη σύνθεση κυκλίνης (έτσι στο εκχύλισμα, υπάρχουν ελεύθερα Cdc2 μονομερή και όλα τα ρυθμιστικά ένζυμα Wee1, Cdc25, CAK, αλλά όχι κυκλίνη B), και πρόσθεσε εξωγενώς μια τροποποιημένη μορφή κυκλίνης B που είναι μη-διασπάσιμη. Μελέτησε ένα μεμονωμένο σύστημα, που παρουσιάζεται στο Σχ. 5.3.



Σχήμα 5.3 Το διάγραμμα σύνδεσης του μοντέλου *Xenopus*, από [10].

Μέτρησε τη χρονική πορεία της ενεργοποίησης MPF καθώς μετέβαλλε την ποσότητα της μη-διασπάσιμης κυκλίνης B. Διαπίστωσε ότι υπάρχει ένα επίπεδο κατώτατων ορίων κυκλίνης B που απαιτείται για την ενεργοποίηση του MPF: κάτω από το οποίο, παρήχθη λίγη δραστηριότητα MPF, αλλά μεγαλύτερη ποσότητα προκάλεσε ιδιαίτερη ενεργοποίηση. Παρατήρησε επίσης ότι υπάρχει μια χρονική καθυστέρηση μεταξύ του χρόνου προσθήκης της κυκλίνης B και της ενεργοποίησης της δραστηριότητας MPF, η χρονική καθυστέρηση φάνηκε να είναι αρκετά σταθερή κατά την εισαγωγή μιας μεγάλης σειράς συγκεντρώσεων κυκλίνης B, μειώνεται ελαφρώς με εισαγωγή υψηλότερης συγκέντρωσης κυκλίνης B.

Οι Novak και Tyson (1993) υπέθεσαν ότι το όριο κυκλίνης για την ενεργοποίηση του MPF, όπως παρατηρείται από τον Solomon, οφείλεται στους βρόχους θετικής ανάδρασης του MPF που ενεργοποιούν το Cdc25 και την παρεμποδίζουν το Wee1. Η εξήγησή τους μπορεί να ερμηνεύσει επίσης τις παρατηρηθείσες χρονικές καθυστερήσεις. Επιπλέον, πρόβλεψαν ότι θα υπάρξει ένα διαφορετικό, αλλά χαμηλότερο όριο κυκλίνης για την αδρανοποίηση του MPF. Υποστήριξαν ότι χρειάζεται υψηλότερη MPF δραστηριότητα για να τεθεί σε λειτουργία ο θετικός βρόχος ανάδρασης· όταν λειτουργεί, απαιτεί τη λιγότερη δραστηριότητα MPF για να κρατηθεί σε λειτουργία, κατά συνέπεια το όριο κυκλίνης για την ενεργοποίηση του MPF είναι υψηλότερο από το όριο για την αδρανοποίηση του MPF.

Ο Marlovits (1998) χρησιμοποίησε τις σταθερές ποσοστού που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά στοιχεία πίνακα κατωτέρω, και βελτίωσε το μοντέλο για να εξηγήσει τα

πειράματα του Solomon και πολλά άλλα πειράματα που περιλαμβάνουν σημεία ελέγχου DNA. Η πρόβλεψη ενός διαφορετικού χαμηλότερου ορίου κυκλίνης για την αδρανοποίηση του MPF επιβεβαιώθηκε πειραματικά από τον Sha (2003) [10].

Το δίκτυο αντίδρασης στο Σχ. 5.1 μπορεί να μετατραπεί σε ένα σύνολο από ODEs για τα χρονικά ποσοστά αλλαγής των συγκεντρώσεων όλων των πρωτεϊνών στο μηχανισμό. Πριν το κάνουμε αυτό, κάνουμε διάφορες απλοποιήσεις στο μηχανισμό. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε εκχύλισμα που συμπληρώνονται με κυκλοεξιμίδιο, ένας ανασταλτικός παράγοντας της πρωτεϊνικής σύνθεσης. Ως εκ τούτου, το εκχύλισμα δεν συνθέτει την κυκλίνη από το δικό του απόθεμα κυκλίνης του mRNA, έτσι θέτουμε $k_1 = 0$ και αγνοούμε αυτήν την αντίδραση. Ο πειραματιστής προσθέτει στο εκχύλισμα μία γνωστή ποσότητα εξωγενούς παραχθέντος κυκλίνης. Σε όλες τις περιπτώσεις, η προστιθέμενη πρωτεϊνική κυκλίνη έχει κατασκευαστεί γενετικά για να είναι ανθεκτική στην ενδιάμεση διάσπαση των κυκλοσωμάτων. Ως εκ τούτου, $k_2 = 0$, και μπορούμε να αγνοήσουμε όλα τα βήματα διάσπασης στο μηχανισμό. Επειδή η κυκλίνη δεν συντίθεται ούτε καταστρέφεται, η συνολική συγκέντρωση της πρωτεϊνικής κυκλίνης στο εκχύλισμα είναι σταθερή:

$$[\text{monomeric cyclin}] + [\text{MPF}] + [\text{preMPF}] = [\text{total cyclin}] = \text{constant}, \quad (5.12)$$

όπου MPF είναι το ενεργό Cdk1: διμερές κυκλίνης και το preMPF αναφέρεται στη φωσφοροποιημένη (χαμηλής δραστηριότητας) μορφή του διμερούς. Έπειτα, κάνουμε τις εξής υποθέσεις (που υποστηρίζονται καλά από το πείραμα): (1) η σύνθεση των μονομερών της κυκλίνης και των μονομερών του Cdk1 είναι πολύ γρήγορη (το k_3 είναι μεγάλο) και (2) $[\text{total Cdk1}] > [\text{total cyclin}]$. Ως εκ τούτου, $[\text{monomeric cyclin}] \ll [\text{total cyclin}]$, και η συνθήκη διατήρησης στις υπομονάδες της κυκλίνης γίνεται

$$[\text{MPF}] + [\text{preMPF}] = [\text{total cyclin}]. \quad (5.13)$$

Με αυτές τις απλοποιήσεις και τις παραδοχές, ο μηχανισμός στο Σχ. 5.1 μπορεί να περιγραφεί με τις ακόλουθες τρεις εξισώσεις

$$\frac{dM}{dt} = (v'_d(1-D) + v''_d D)(C_T - M) - (v'_w(1-W) + v''_w W)M, \quad (5.14)$$

$$\frac{dD}{dt} = v_d \left(\frac{M(1-D)}{K_{md} + (1-D)} - \frac{\rho_d D}{K_{mdr} + D} \right), \quad (5.15)$$

$$\frac{dW}{dt} = v_w \left(-\frac{MW}{K_{mw} + W} + \frac{\rho_w(1-W)}{K_{mwr} + (1-W)} \right), \quad (5.16)$$

όπου

$$M = [\text{MPF}]/[\text{total Cdk1}],$$

$$D = [\text{Cdc25P}]/[\text{total Cdc25}],$$

$$W = [\text{Wee1}]/[\text{total Wee1}],$$

$$C_T = [\text{total cyclin}]/[\text{total Cdk1}].$$

Στις εξισώσεις (5.14)-(5.16), ο χρόνος εκφράζεται σε λεπτά, και όλες οι συγκεντρώσεις είναι αδιάστατοι αριθμοί, που έχουν βαθμονομηθεί σχετικά με κάποια κατάλληλη συγκέντρωση αναφοράς. Στα εκχυλίσματα αυγών βατράχων, η [Cdk1] είναι τυπικά κοντά στα 100 nM. Οι συνολικές συγκεντρώσεις των Cdc25, Wee1 και PPase είναι άγνωστες, έτσι θέτουμε κάθε μία σε 1 Au (αυθαίρετη μονάδα). Όλα τα v_s είναι σταθερές ποσοστού ψευδο-πρώτης-τάξης (units = time⁻¹). Όλα τα K_s είναι αδιάστατες σταθερές Michaelis, δηλ., αναλογίες των αληθινών σταθερών Michaelis (K^* , units = concentration) στις συγκεντρώσεις αναφοράς. Τα ρ_s είναι αδιάστατοι αριθμοί που εκφράζουν τη δραστηριότητα της φωσφατάσης (PPase, στο Σχ. 5.1) σχετικά με τον MPF. Οι σταθερές ποσοστού αναφέρονται στις ακόλουθες αντιδράσεις:

v'_d - αποφωσφοροποίηση του preMPF από το Cdc25 στη λιγότερο ενεργό μορφή του,

v''_d - αποφωσφοροποίηση του preMPF από το Cdc25 στην περισσότερο ενεργό μορφή του,

v'_w - φωσφοροποίηση του MPF από το Wee1 στη λιγότερο ενεργό μορφή του,

v''_w - φωσφοροποίηση του MPF από το Wee1 στην περισσότερο ενεργό μορφή του,

v_d - φωσφοροποίηση του Cdc25 από τον MPF,

$v_d \rho_d$ - αποφωσφοροποίηση του Cdc25 από το PPase,

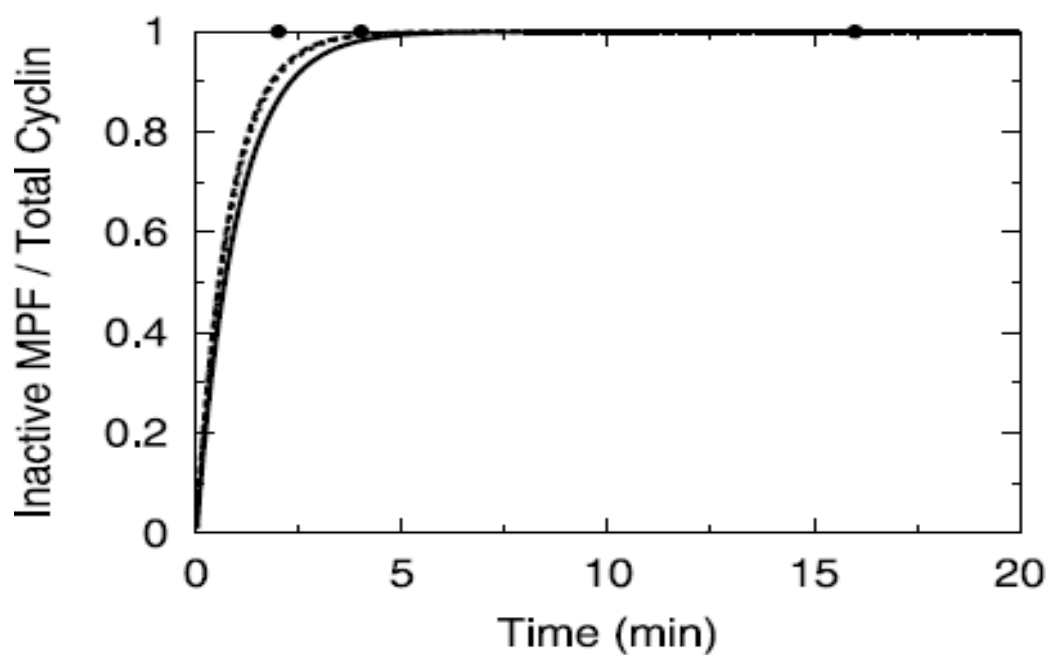
v_w - φωσφοροποίηση του Wee1 από τον MPF,

$v_w \rho_w$ - αποφωσφοροποίηση του Wee1 από το PPase.

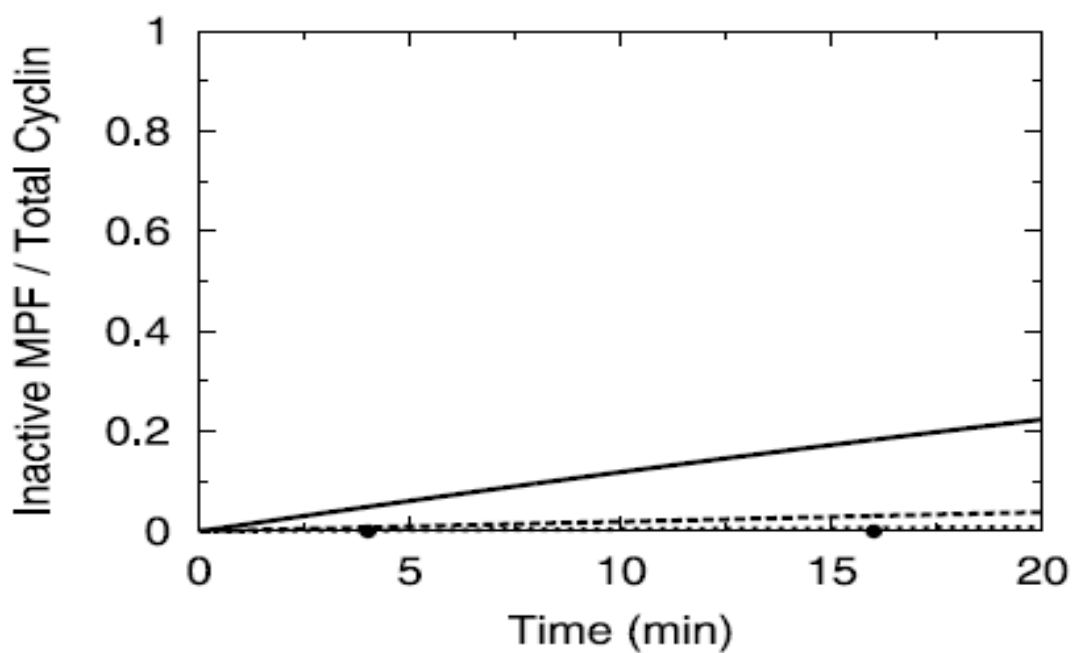
Ο Πίν. 5.1 δείχνει τις τιμές των παραμέτρων στις εξισώσεις (5.14)-(5.16), που χρησιμοποιήθηκαν κατά την προσομοίωση του μοντέλου με τη χρήση του προγράμματος Simulink. Στα Σχ. 5.4 – 5.11 παρουσιάζονται τα πειραματικά δεδομένα (•) που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση παραμέτρων, και οι προσομοιώσεις (—) που παρήχθησαν από τις παραμέτρους του Marlovits et al (1998), και στον Πιν. 5.2 περιγράφεται πως πρέπει να προσομοιωθεί κάθε πείραμα από τις εξισώσεις του μοντέλου (5.14)-(5.16).

Πίνακας 5.1 Οι υπολογισμένες τιμές παραμέτρων και οι τιμές των αρχικών συνθηκών του μοντέλου, από [26].

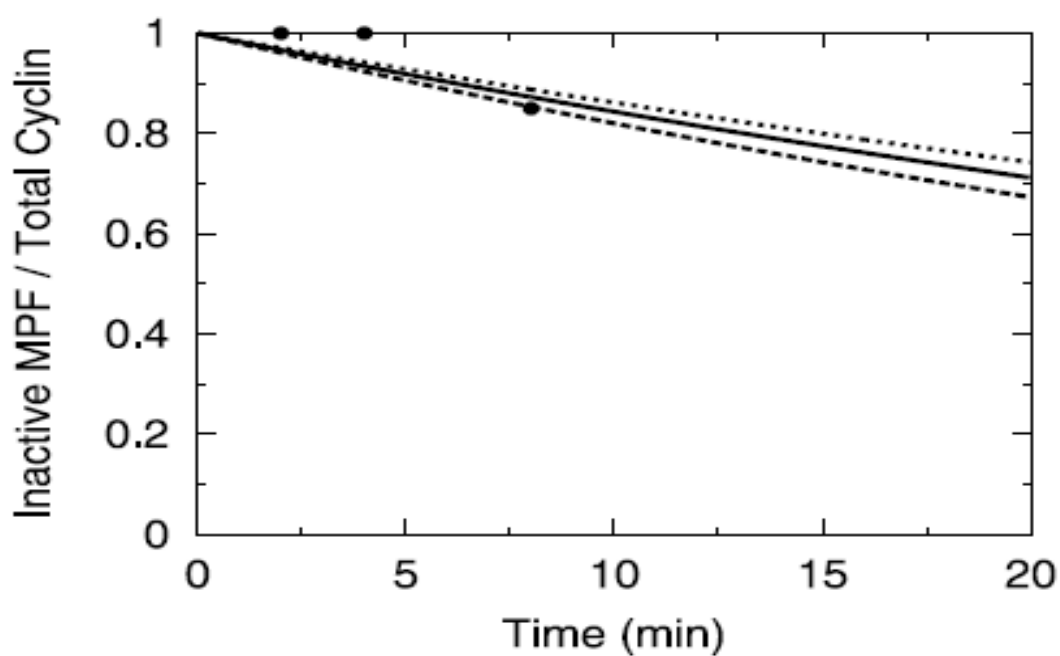
<i>Name</i>	<i>Value</i>
v'_d	0.017
v''_d	0.17
ρ_d	0.05
v'_w	0.01
v''_w	1.0
ρ_w	0.05
K_{md}	0.1
K_{mdr}	1.0
K_{mw}	0.1
K_{mwr}	1.0
v_d	2.0
v_w	2.0
[totalCdk1]	100 nM
[totalCdc25]	1 AU _d
[totalWee1]	1 AU _w
[PPase]	1 AU _p



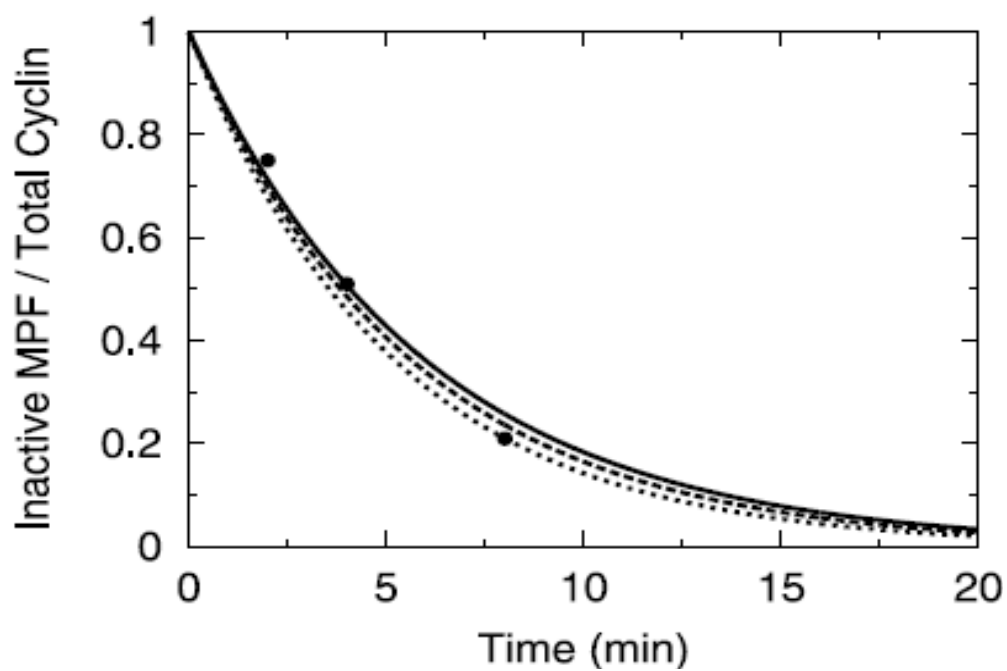
Σχήμα 5.4 Πείραμα (A) φωσφοροποίηση του MPF κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, όταν το Wee1 είναι περισσότερο ενεργό, από [26].



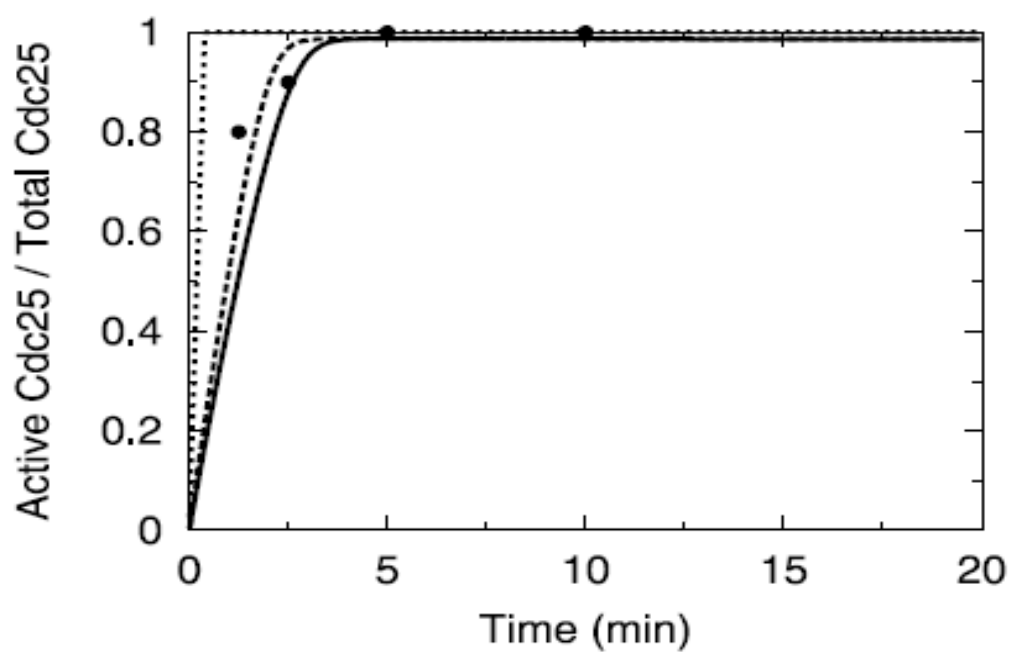
Σχήμα 5.5 Πείραμα (B) φωσφοροποίηση του MPF κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όταν το Wee1 είναι λιγότερο ενεργό, από [26].



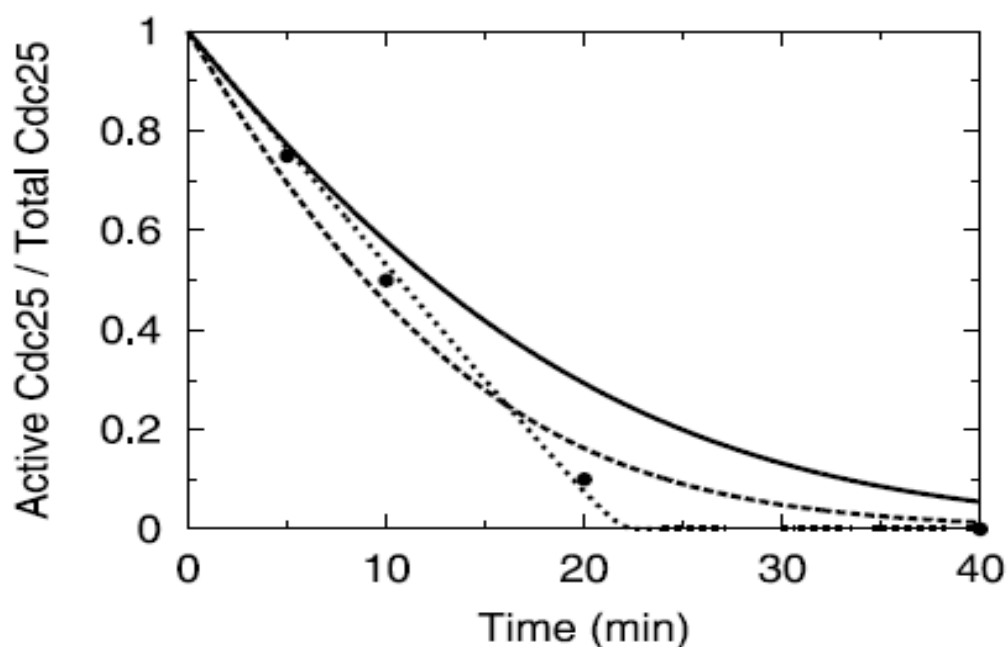
Σχήμα 5.6 Πείραμα (C) αποφωσφοροποίηση του preMPF κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, όταν το Cdc25 είναι λιγότερο ενεργό, από [26].



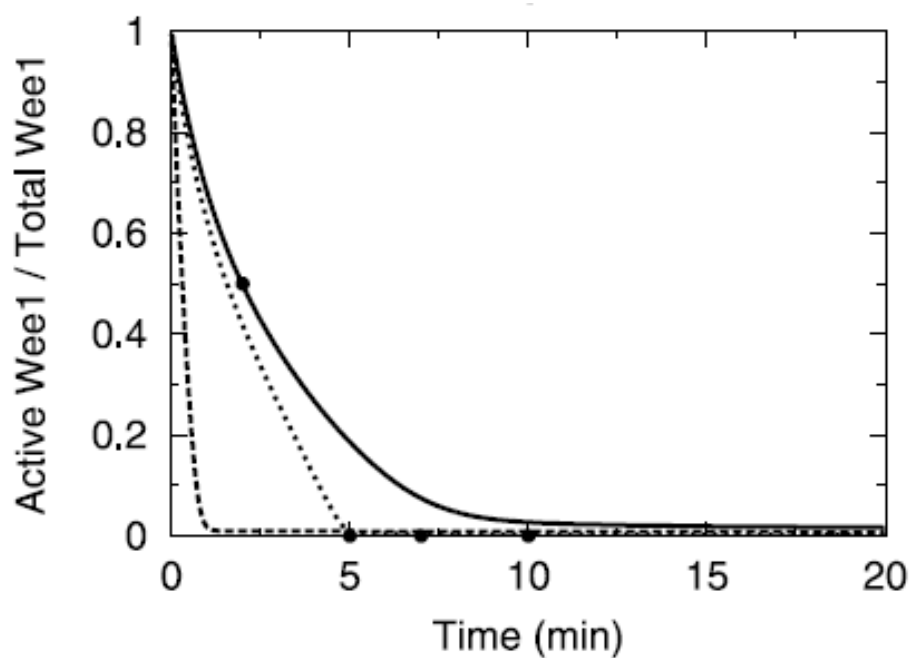
Σχήμα 5.7 Πείραμα (D) αποφωσφοροποίηση του preMPF κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όταν το Cdc25 είναι περισσότερο ενεργό, από [26].



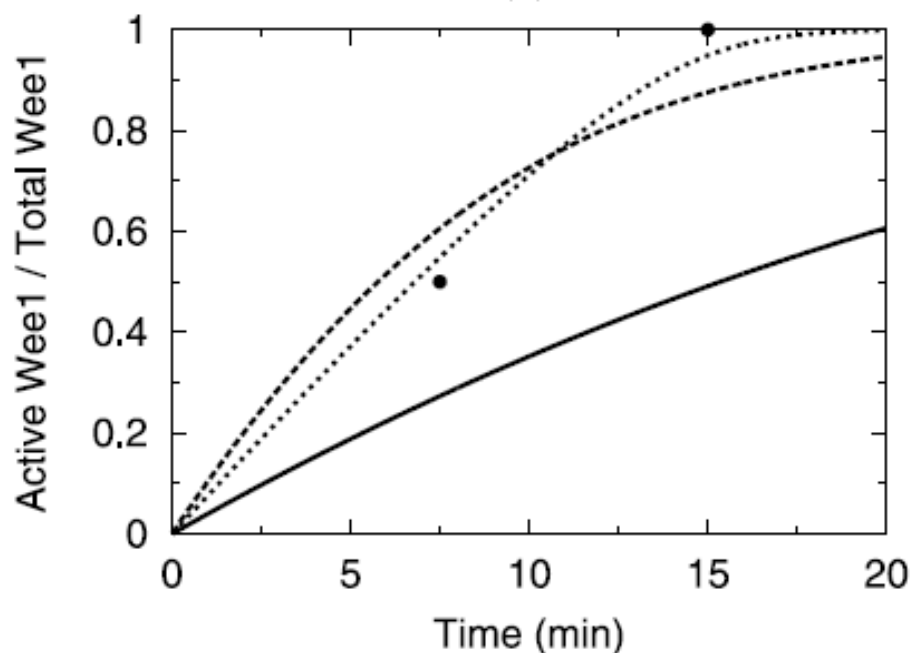
Σχήμα 5.8 Πείραμα (E) φωσφοροποίηση του Cdc25 κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όταν ο MPF είναι περισσότερο ενεργός, από [26].



Σχήμα 5.9 Πείραμα (F) αποφωσφοροποίηση του Cdc25 κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, από [26].



Σχήμα 5.10 Πείραμα (G) φωσφοροποίηση του Wee1 κατά τη διάρκεια της μίτωσης, όταν ο MPF είναι περισσότερο ενεργός, από [26].



Σχήμα 5.11 Πείραμα (H) αποφωσφοροποίηση του Wee1 κατά τη διάρκεια της μεσόφασης, από [26].

Πίνακας 5.2 Τιμές παραμέτρων και αρχικές συνθήκες για κάθε πείραμα των Σχ. 5.4 - 5.11, από [26].

<i>Exp</i>	<i>Params</i>	<i>Initial Conditions</i>		
	<i>C_T</i>	<i>M</i>	<i>D</i>	<i>W</i>
A	0	0	0	1
B	1	1	1	0
C	0	0	0	1
D	1	1	1	0
E	0.25	0.25	0	0
F	0	0	1	0
G	0.254	0.254	1	1
H	0	0	1	0

Για τα πειράματα A και B, οι εξισώσεις (5.14)-(5.16) συμπληρώνονται από την εξίσωση

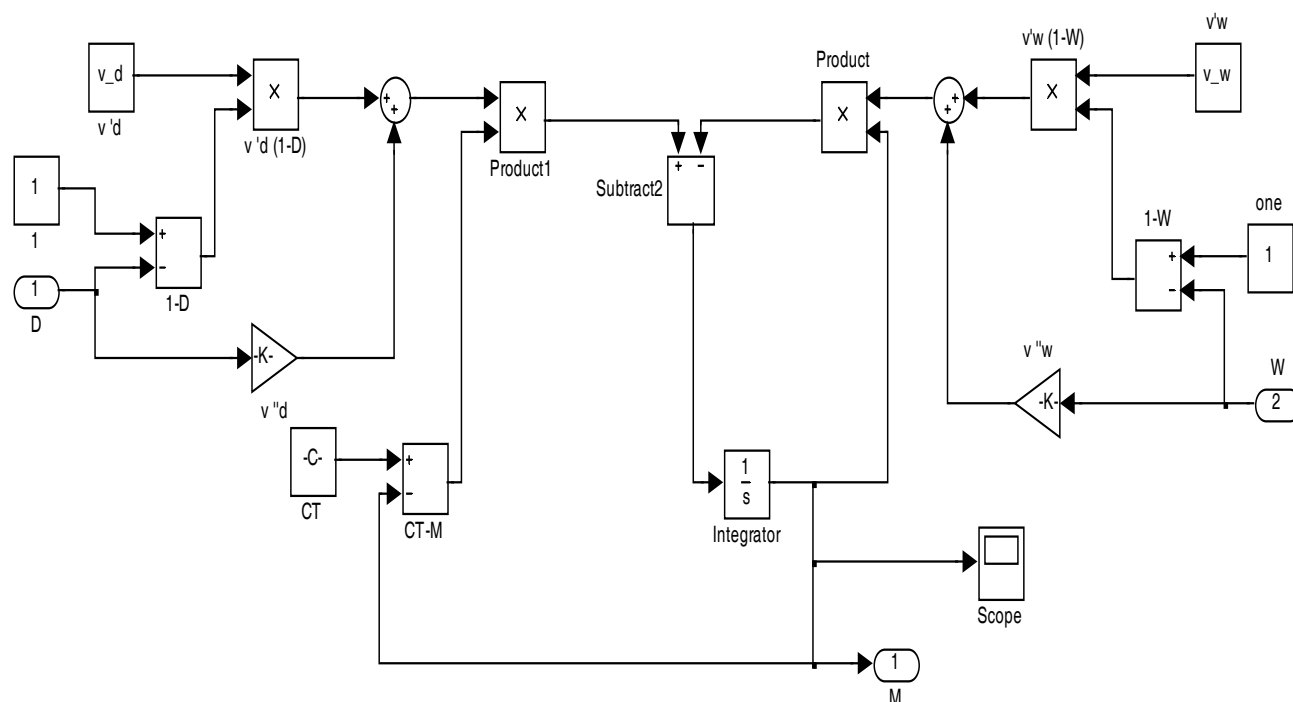
$$\frac{dL}{dt} = (v'_w(1 - W) + v''_w W)(1 - L), \quad L(0) = 0. \quad (5.17)$$

Για τα πειράματα C και D, οι εξισώσεις (5.14)-(5.16) συμπληρώνονται από την εξίσωση [26]

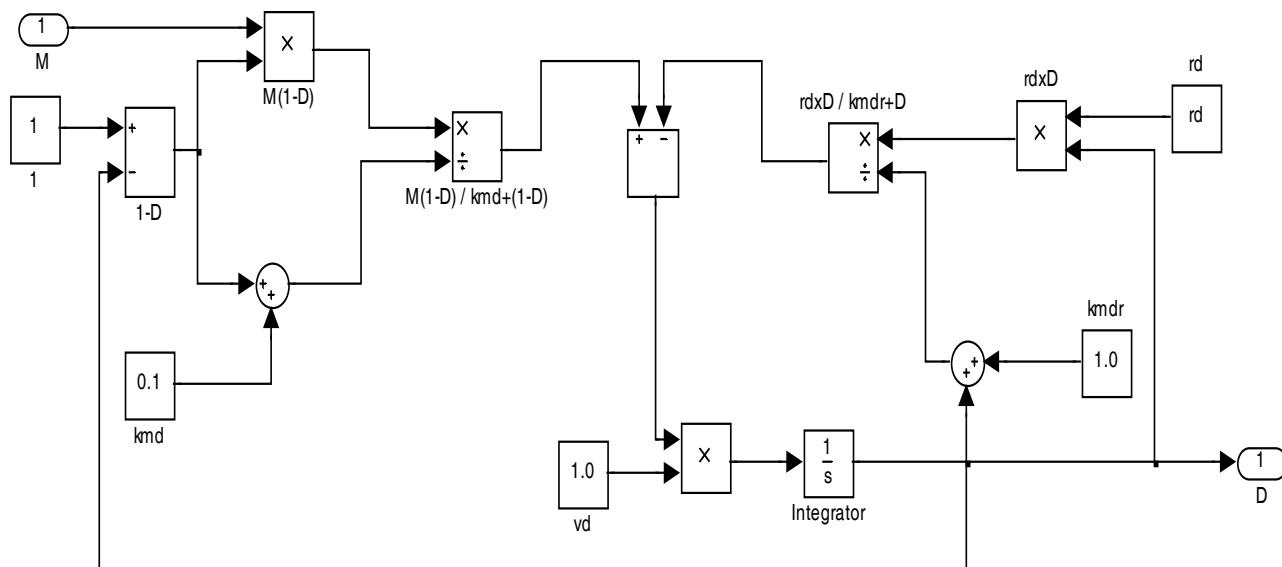
$$\frac{dL_p}{dt} = -(v'_d(1-D) + v''_d D)L_p, \quad L_p(0) = 1. \quad (5.18)$$

5.4 ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΜΕ SIMULINK

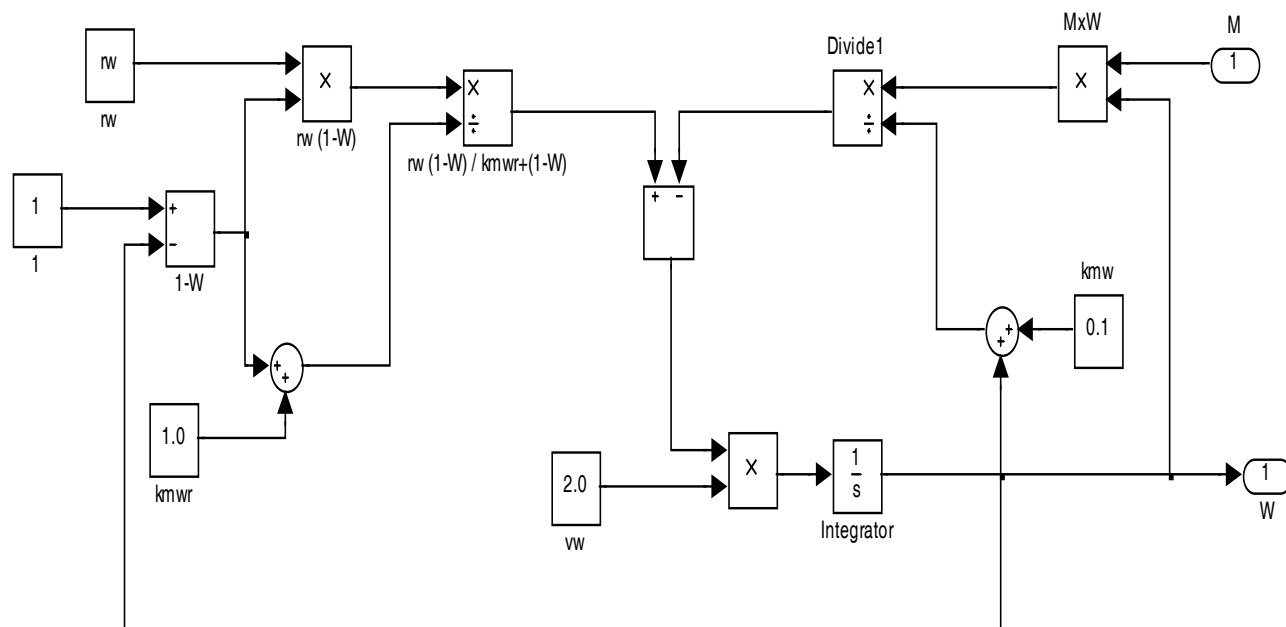
Στη συνέχεια προσομοιώνουμε τις εξισώσεις (5.14) - (5.18) με τη βοήθεια του Simulink (σχήματα 5.12 – 5.16). Έτσι το μοντέλο Xenopus θα έχει τη μορφή του σχήματος 5.17 για τα πειράματα (A) και (B), τη μορφή του σχήματος 5.18 για τα πειράματα (C) και (D) και τη μορφή του σχήματος 5.19 για τα πειράματα (E), (F), (G), (H). Κάθε εξίσωση του μοντέλου αναπαρίσταται από ένα υποσύστημα και τα πειραματικά δεδομένα λαμβάνονται από το περιβάλλον του Matlab. Οι αντίστοιχες γραφικές παραστάσεις που παίρνουμε από τα πειράματα (A) - (H) παρουσιάζονται στα σχήματα 5.20 - 5.27 (τα πειραματικά δεδομένα απεικονίζονται με γραμμή χρώματος ροζ και τα δεδομένα της προσομοίωσης απεικονίζονται με γραμμή κίτρινου χρώματος).



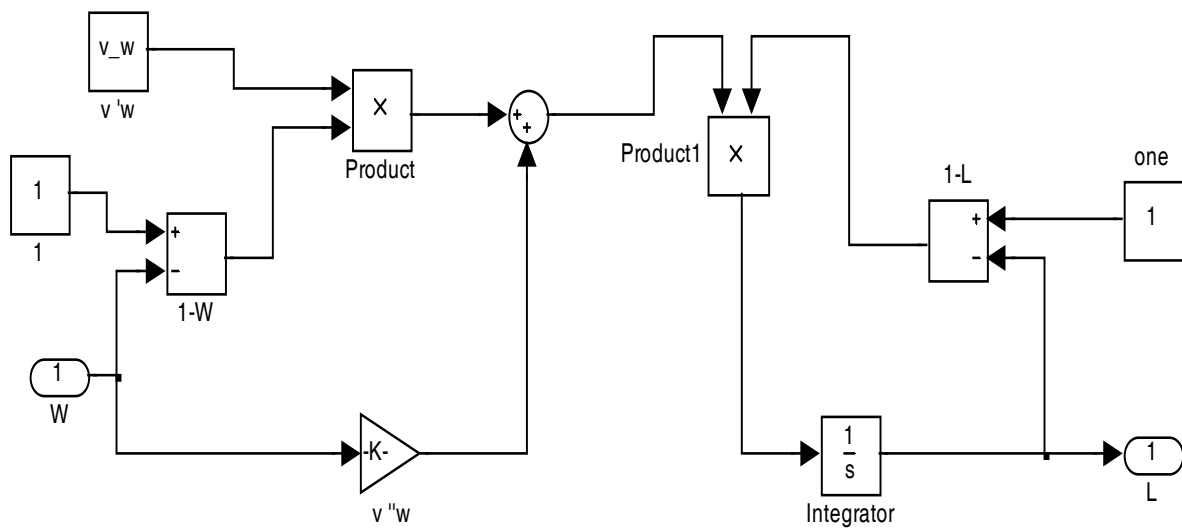
Σχήμα 5.12 Η προσομοίωση με Simulink της εξίσωσης (5.14)



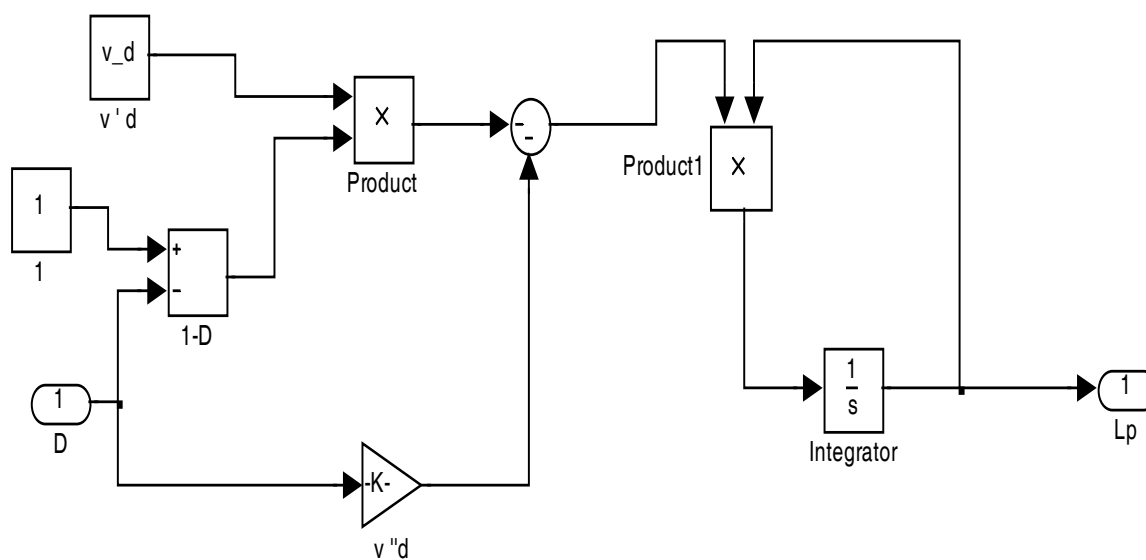
Σχήμα 5.13 Η προσομοίωση με Simulink της εξίσωσης (5.15)



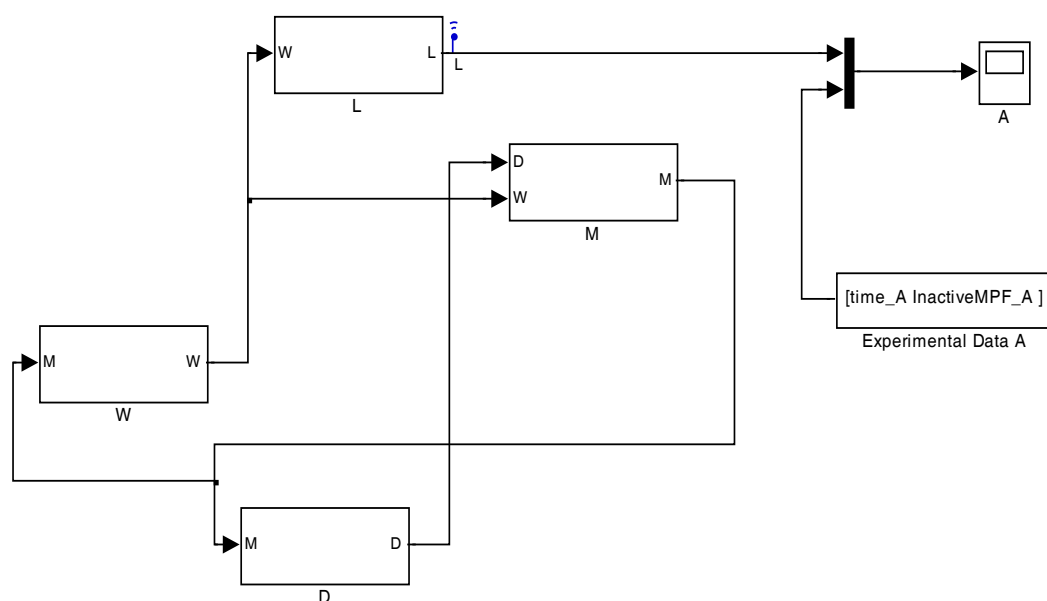
Σχήμα 5.14 Η προσομοίωση με Simulink της εξίσωσης (5.16)



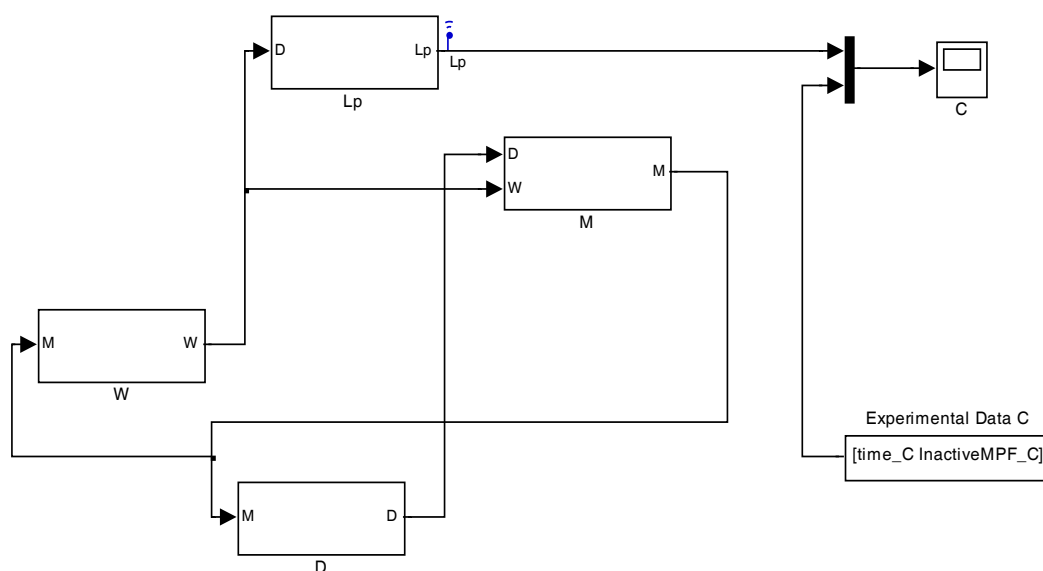
Σχήμα 5.15 Η προσομοίωση με Simulink της εξίσωσης (5.17)



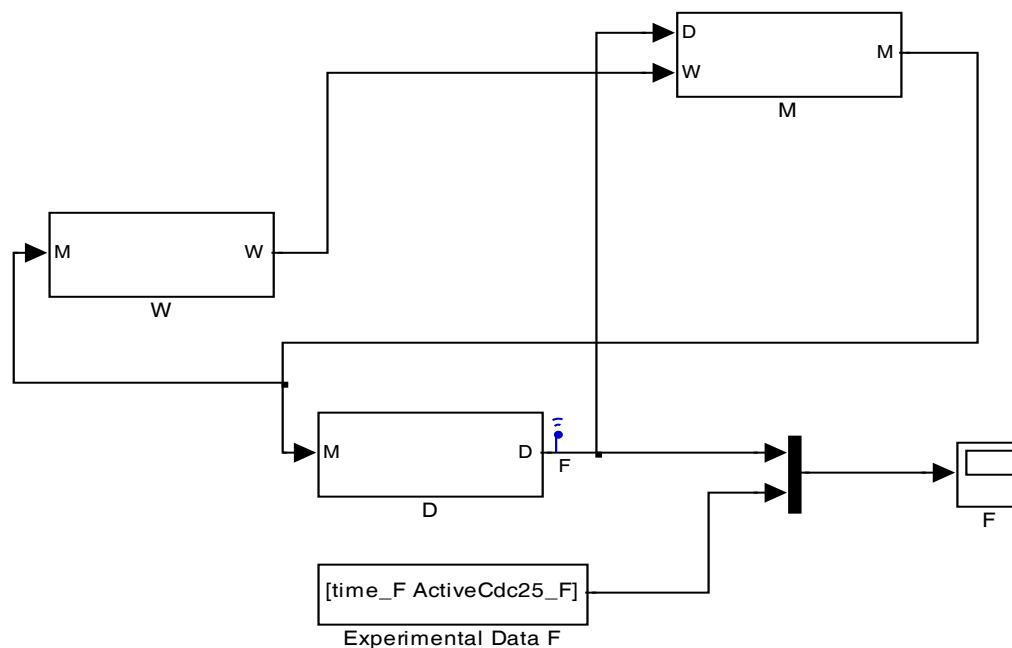
Σχήμα 5.16 Η προσομοίωση με Simulink της εξίσωσης (5.18)



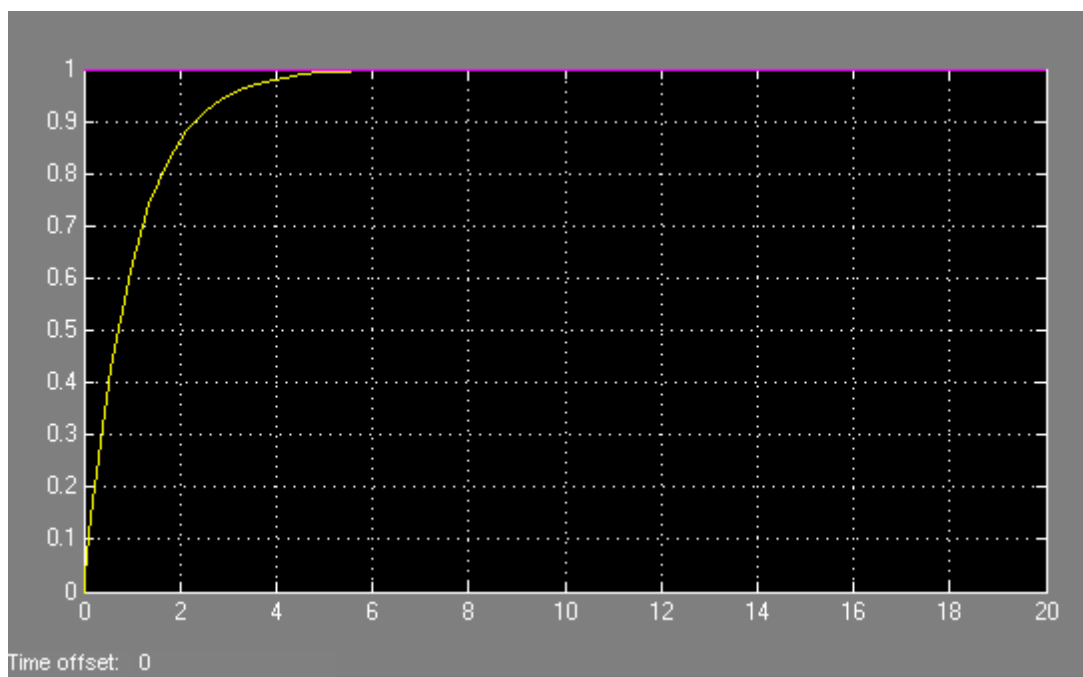
Σχήμα 5.17 Η μορφή του μοντέλου Xenopus για τα πειράματα (A) και (B)



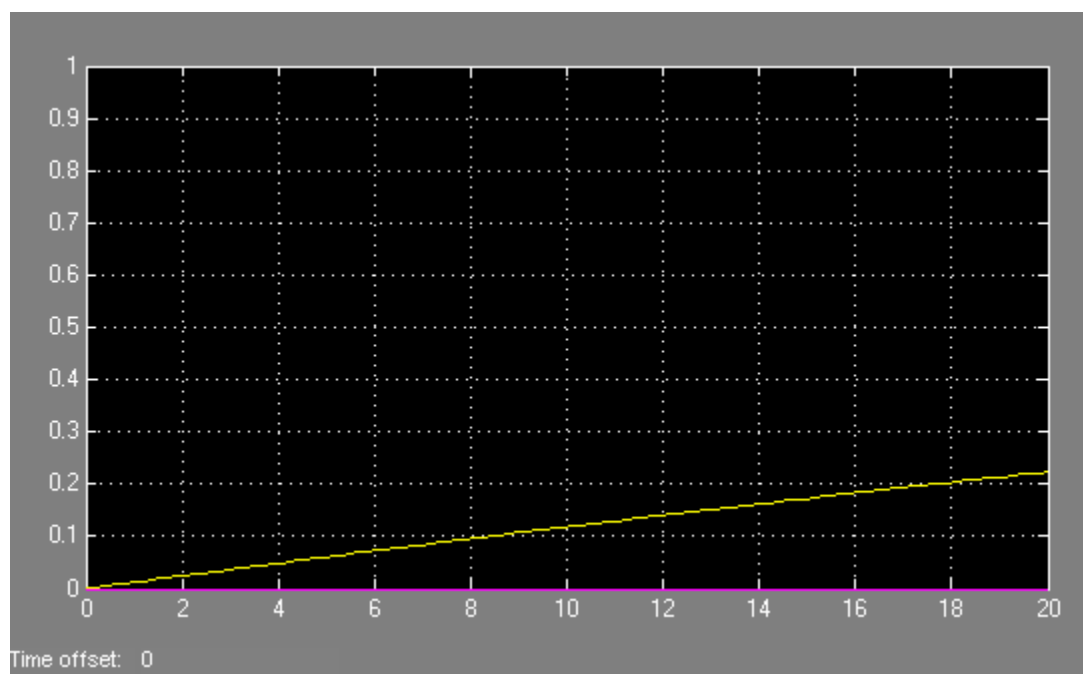
Σχήμα 5.18 Η μορφή του μοντέλου Xenopus για τα πειράματα (C) και (D).



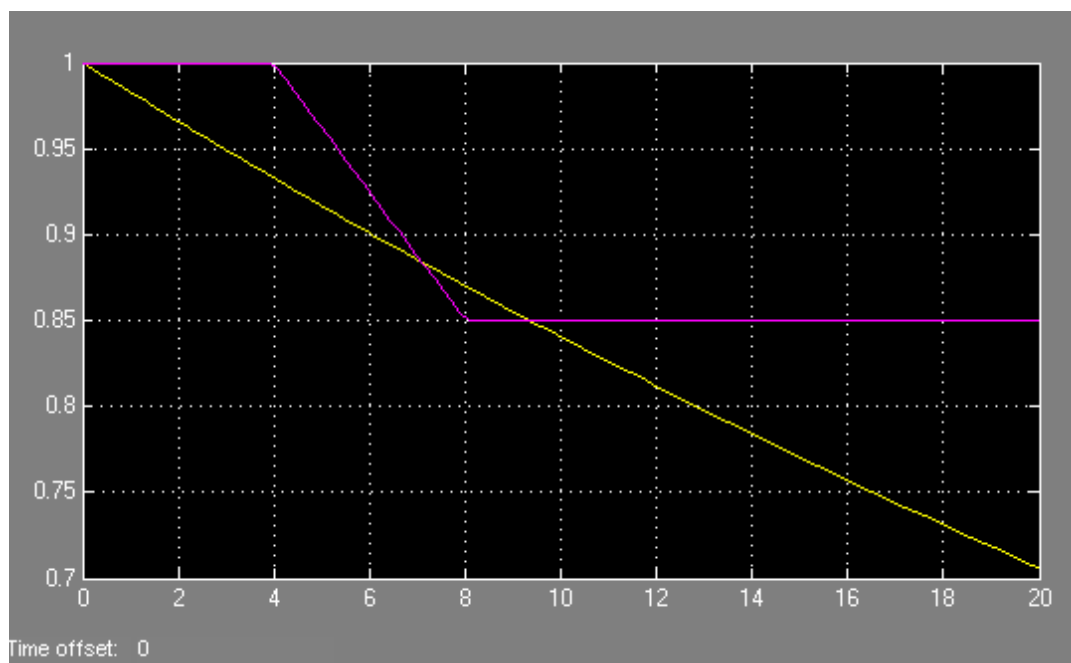
Σχήμα 5.19 Η μορφή του μοντέλου Xenopus για τα πειράματα (E), (F), (G), (H).



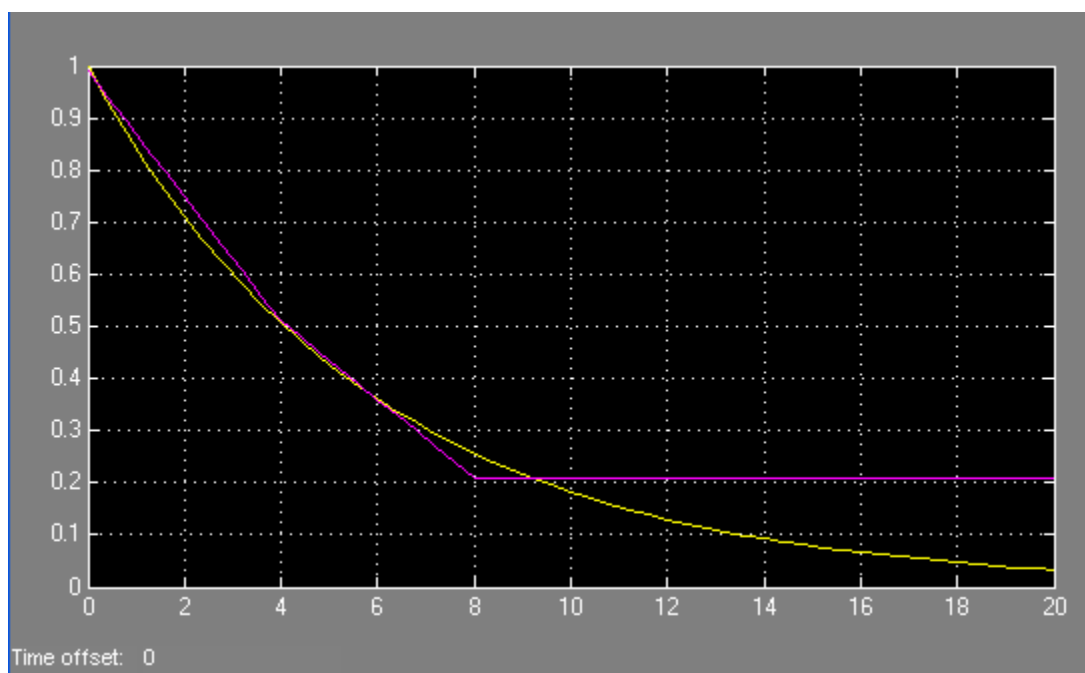
Σχήμα 5.20 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (Α).



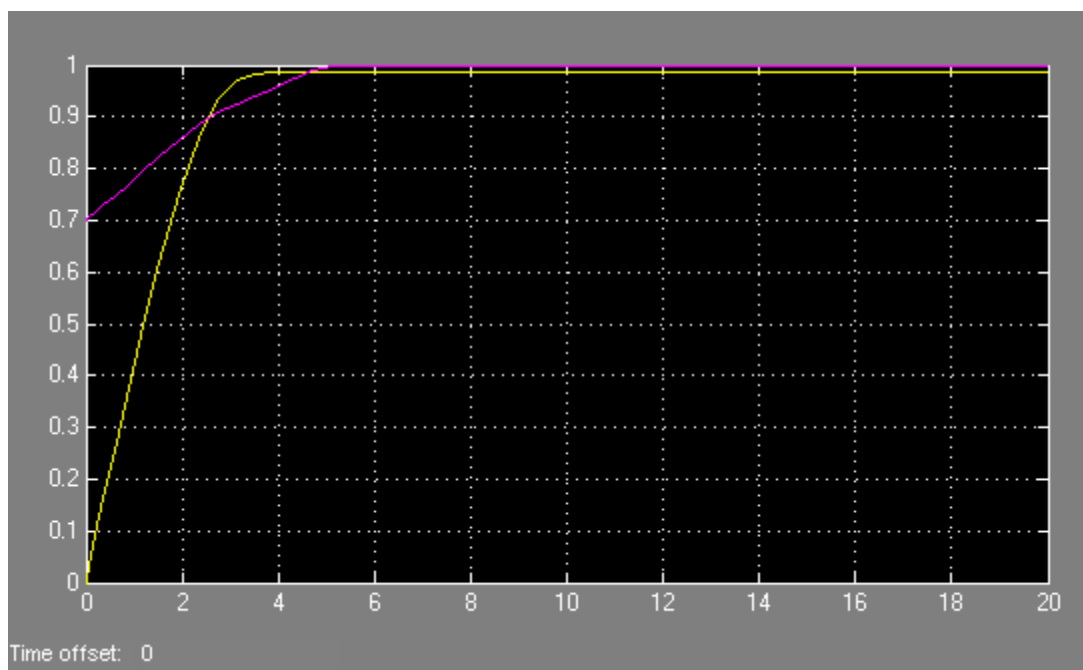
Σχήμα 5.21 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (Β).



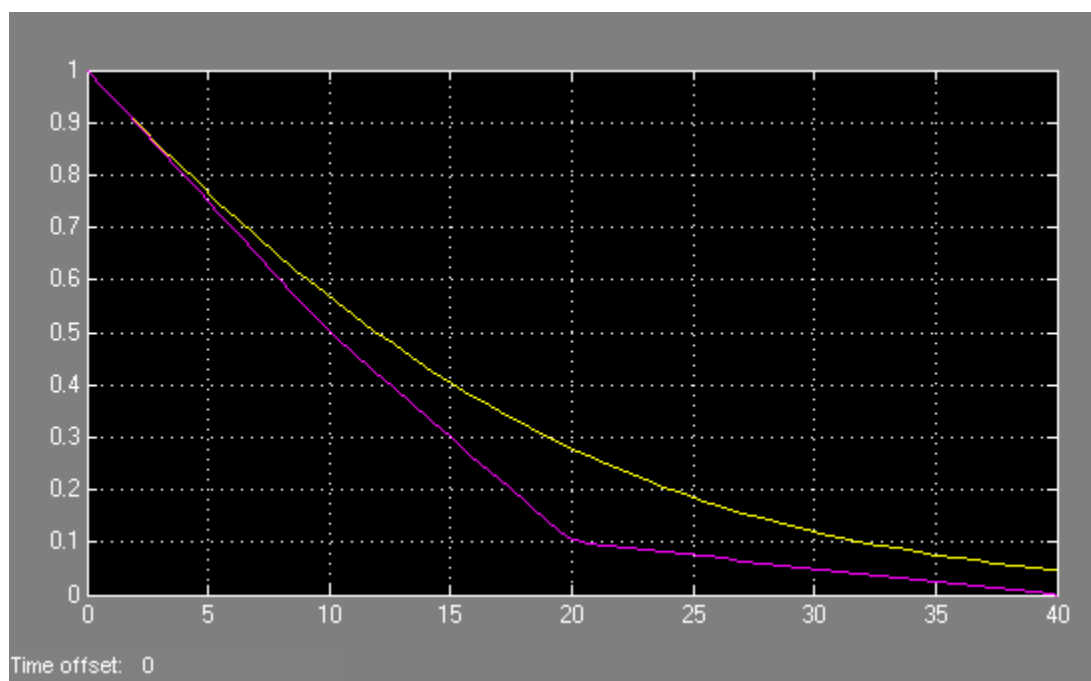
Σχήμα 5.22 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (C).



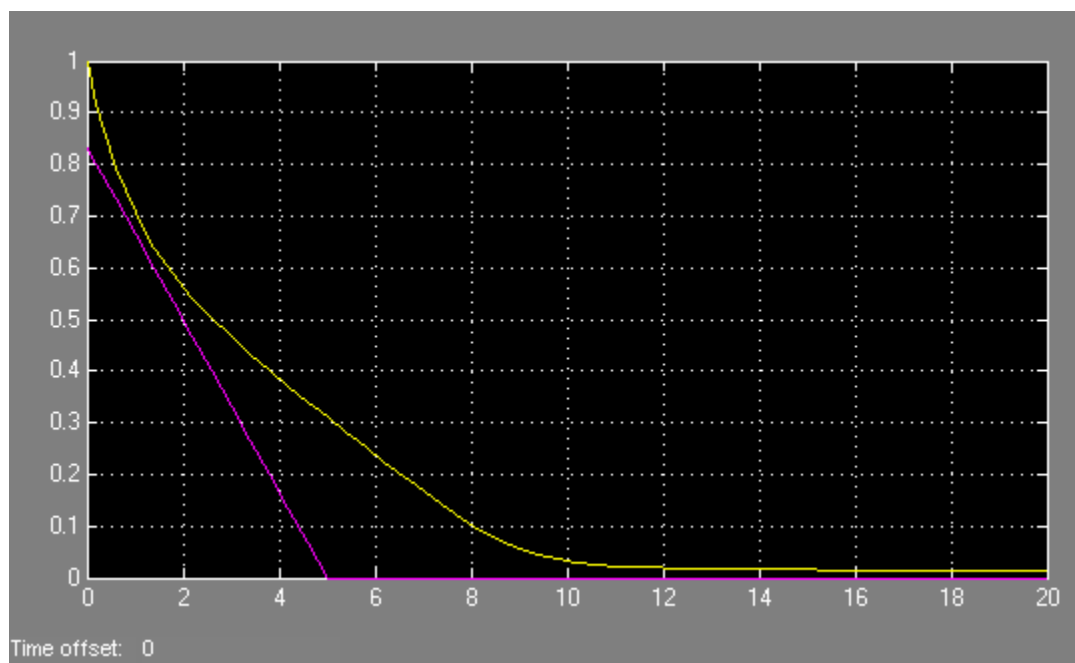
Σχήμα 5.23 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (D).



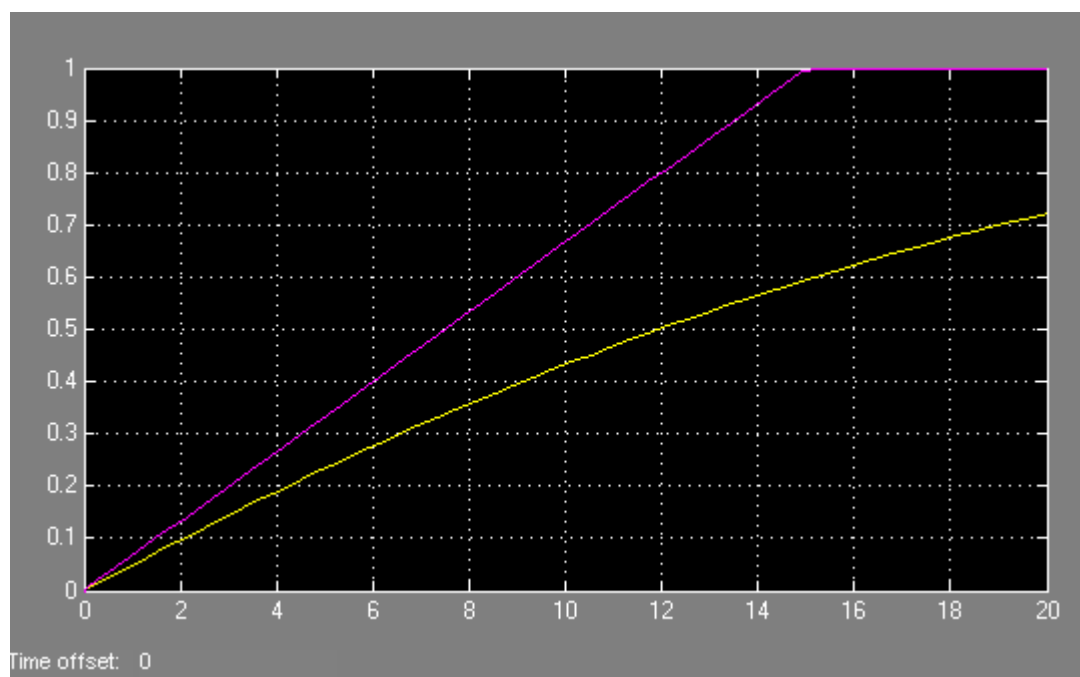
Σχήμα 5.24 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (E).



Σχήμα 5.25 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (F).



Σχήμα 5.26 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (G).



Σχήμα 5.27 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (H).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ XENOPUS

6.1 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΜΕ ΤΟ SIMULINK PARAMETER ESTIMATION

Το Simulink Parameter Estimation είναι ένα προϊόν βασισμένο στο Simulink για τον υπολογισμό και τη βαθμονόμηση των παραμέτρων ενός μοντέλου από τα πειραματικά δεδομένα. Το Simulink Parameter Estimation συγκρίνει τα πειραματικά στοιχεία με τα στοιχεία που παράγονται από ένα μοντέλο Simulink. Χρησιμοποιώντας τεχνικές βελτιστοποίησης, υπολογίζει αρχικές συνθήκες και/ή παραμέτρους έτσι ώστε μια επιλεγμένη από τον χρήστη συνάρτηση κόστους, που χαρακτηριστικά περιλαμβάνει το least-square error μεταξύ των δύο σημάτων στοιχείων, ελαχιστοποιείται. Εάν η βελτιστοποίηση πήγε καλά, πρέπει να δούμε τη συνάρτηση κόστους να συγκλίνει σε μια ελάχιστη τιμή. Όσο χαμηλότερο το κόστος, τόσο επιτυχέστερη είναι η εκτίμηση.

Στόχος μας, είναι να βρούμε ένα καλύτερο σύνολο τιμών για τις παραμέτρους του μοντέλου Xenopus, αφού το σύνολο των τιμών που έχει χρησιμοποιηθεί κατά την προσομοίωση έχει υπολογιστεί με το χέρι. Για την δική μας εκτίμηση χρησιμοποιήσαμε τις αρχικές τιμές των παραμέτρων [26] όπως φαίνονται στον Πίνακα 6.2. Τα πειραματικά δεδομένα (όπως φαίνονται στον Πίνακα A.1) λαμβάνονται από το περιβάλλον του Matlab σαν Matlab variables . Για να είναι η εκτίμησή μας πιο ακριβής, θέσαμε ανώτατο και κατώτατο όριο τιμών στις παραμέτρους (Πιν. 6.1). Χρησιμοποιήσαμε τον solver ode45, ο οποίος είναι ένας συνεχής solver μεταβλητού βήματος, βασισμένος σε έναν σαφή τύπο Runge-Kutta (4,5), το ζευγάρι Dormand-Prince. Είναι solver ενός βήματος, δηλαδή στον υπολογισμό του $y(tn)$, χρειάζεται μόνο τη λύση στο αμέσως προηγούμενου χρονικού σημείου, $y(tn-1)$.

Η μέθοδος βελτιστοποίησης που θα χρησιμοποιήσουμε καθορίζεται από τον αλγόριθμο και το μέγεθος του μοντέλου. Για τον αλγόριθμο εύρεσης παραμέτρων, οι τέσσερις επιλογές είναι:

- Gradient descent - χρησιμοποιεί τη συνάρτηση fmincon του Optimization Toolbox για να βελτιστοποιήσει το σήμα απόκρισης που υπόκειται στους περιορισμούς. Ο Gradient

descent ρυθμίζει τα βάρη και τις στατιστικές αποκλίσεις προκειμένου να βρεθεί το γενικό ελάχιστο του λάθους για ένα δίκτυο. Ο αλγόριθμος Gradient descent είναι γενικά πολύ αργός επειδή απαιτεί μικρά ποσοστά εκπαίδευσης για μια σταθερή εκπαίδευση του αλγόριθμου.

- Nonlinear least-squares - χρησιμοποιεί έναν nonlinear least-squares αλγόριθμο βελτιστοποίησης, ο οποίος χρησιμοποιεί τις μεθόδους trust-region, Gauss-Newton και Levenberg-Marquardt.
- Pattern search - χρησιμοποιεί έναν προηγμένο αλγόριθμο αναζήτησης προτύπων. Αυτή η επιλογή απαιτεί το γενετικό αλγόριθμο και την άμεση εργαλειοθήκη αναζήτησης. Ο αλγόριθμος pattern search βρίσκει μια ακολουθία σημείων, x_0, x_1, x_2, \dots , η οποία πλησιάζει το βέλτιστο σημείο. Η τιμή της αντικειμενικής συνάρτησης στην ακολουθία μειώνεται από κάθε σημείο στο επόμενο.
- Simplex search - χρησιμοποιεί τη συνάρτηση fminsearch του Optimization Toolbox, μια άμεση μέθοδο αναζήτησης, για να βελτιστοποιήσει την απόκριση. Η simplex search είναι πιο χρήσιμη για απλά προβλήματα και είναι μερικές φορές γρηγορότερη από την ελαχιστοποίηση συνάρτησης για μοντέλα που περιέχουν ασυνέχειες.

Ο αλγόριθμος βελτιστοποίησης που χρησιμοποιήσαμε τελικά (βλ. Παράγραφο 6.2) είναι ο nonlinear least squares (μη γραμμικά ελάχιστα τετράγωνα).

Η αρχική εκτίμηση του συνόλου τιμών των παραμέτρων φαίνεται στον Πίνακα 6.2. Η τελική τιμή των παραμέτρων (Πιν. 6.3) έχει υπολογιστεί ξανακάνοντας εκτίμηση με αρχική τιμή για κάθε παράμετρο αυτή της αρχικής εκτίμησης.

Πίνακας 6.1 Το εύρος των τιμών των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκε κατά την εκτίμησή τους, από [27].

Παράμετρος	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
v'_d	0	1
v''_d	0	10
ρ_d	0	1
v'_w	0	1
v''_w	0	10
ρ_w	0	1
K_{md}	0	10
K_{mdr}	0	100
K_{mwr}	0	10

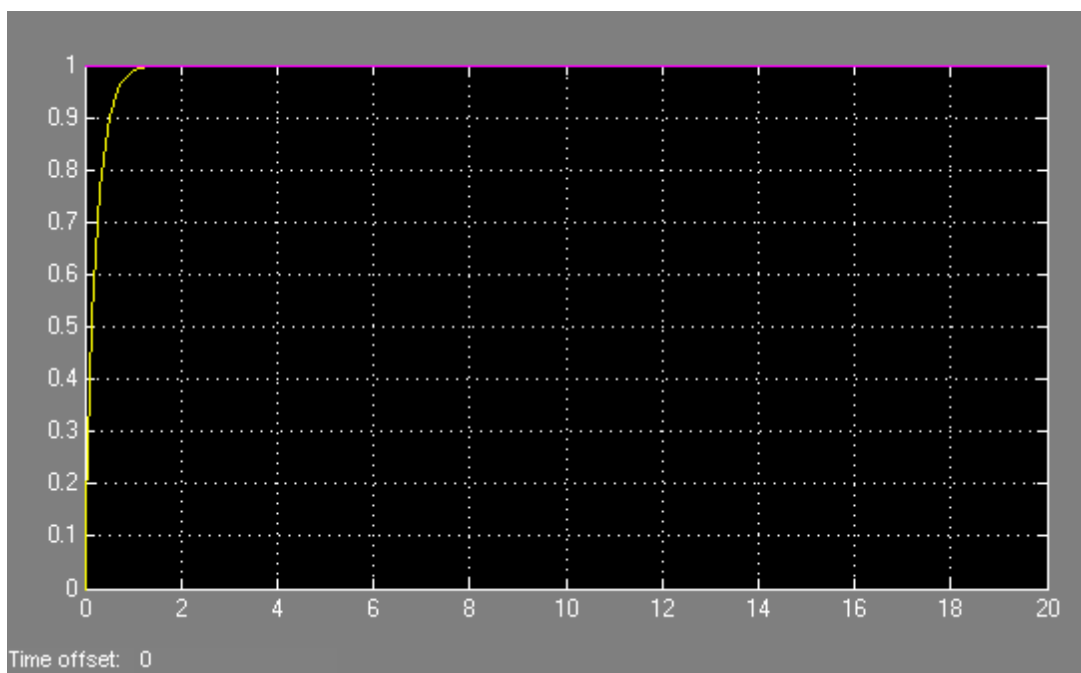
Πίνακας 6.2 Τιμές της αρχικής εκτίμησης των παραμέτρων του μοντέλου

Παράμετρος	Σταθερή	Αρχική τιμή	Αρχική Εκτίμηση
v'_d	όχι	0.017	0.014381
v''_d	όχι	0.17	0.17322
ρ_d	όχι	0.05	0.065103
v'_w	όχι	0.01	$9.3397 \cdot 10^{-7}$
v''_w	όχι	1.0	0.57572
ρ_w	όχι	0.05	0.099257
K_{md}	ναι	0.1	0.1
K_{mdr}	ναι	1.0	1.0
K_{mwr}	ναι	0.1	0.1

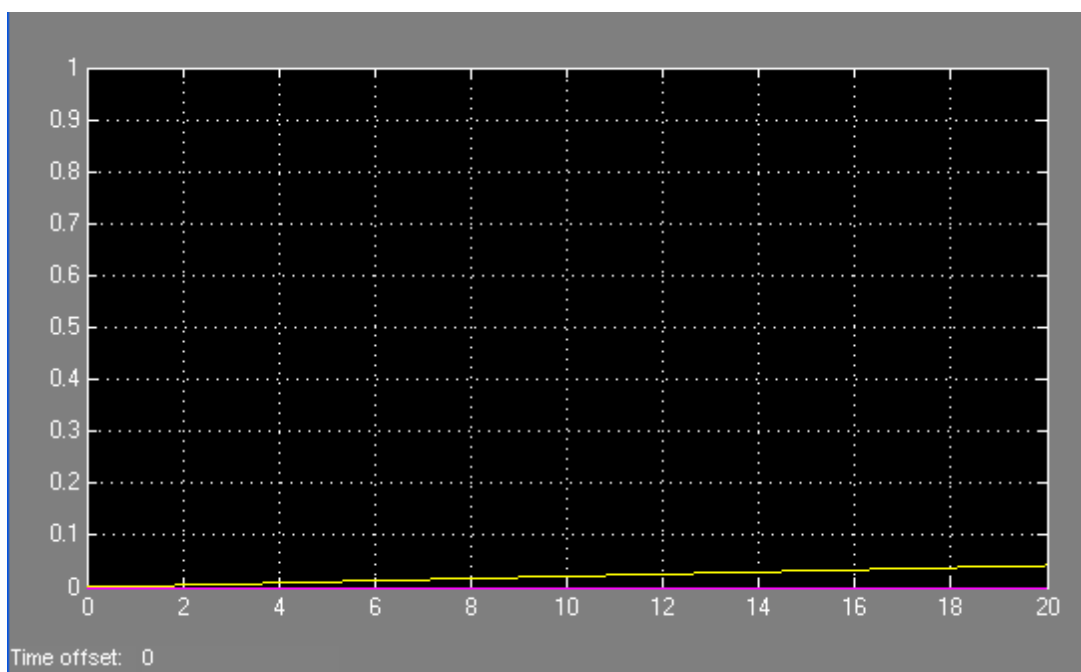
Πίνακας 6.3 Τελικές τιμές των παραμέτρων του μοντέλου

Παράμετρος	Σταθερή	Αρχική τιμή	Τελική τιμή
v'_d	όχι	0.017	0.014376
v''_d	όχι	0.17	0.17322
ρ_d	όχι	0.05	0.065102
v'_w	όχι	0.01	$9.3394 \cdot 10^{-7}$
v''_w	όχι	1.0	0.57708
ρ_w	όχι	0.05	0.099271
K_{md}	ναι	0.1	0.1
K_{mdr}	ναι	1.0	1.0
K_{mwr}	ναι	0.1	0.1

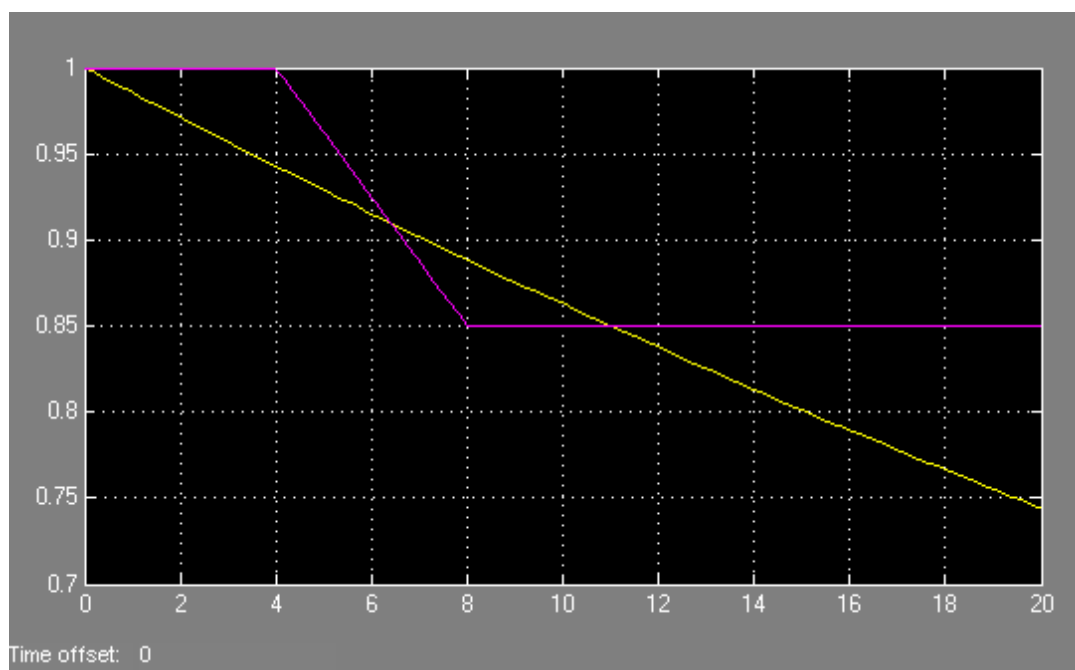
Μετά την εκτίμηση των τιμών των παραμέτρων του μοντέλου, οι γραφικές παραστάσεις που λαμβάνουμε από τα πειράματα (Α) – (Η) είναι σαφώς καλύτερες (Σχήματα 6.1-6.8), αφού τα δεδομένα της προσομοίωσης είναι πιο κοντά στα πειραματικά δεδομένα.



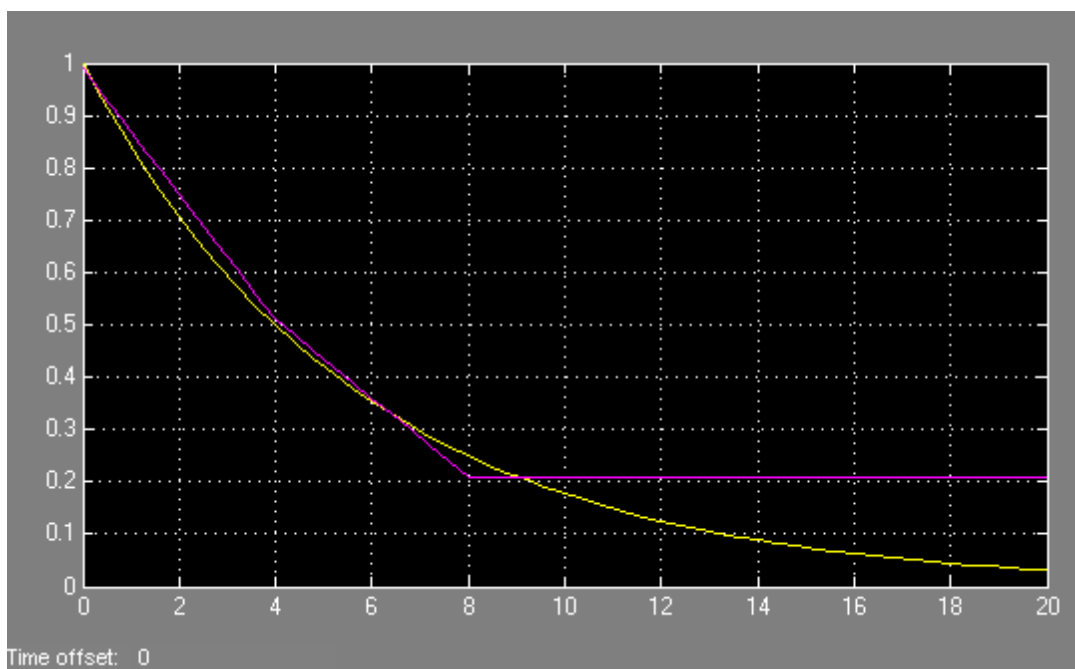
Σχήμα 6.1 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (Α), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.



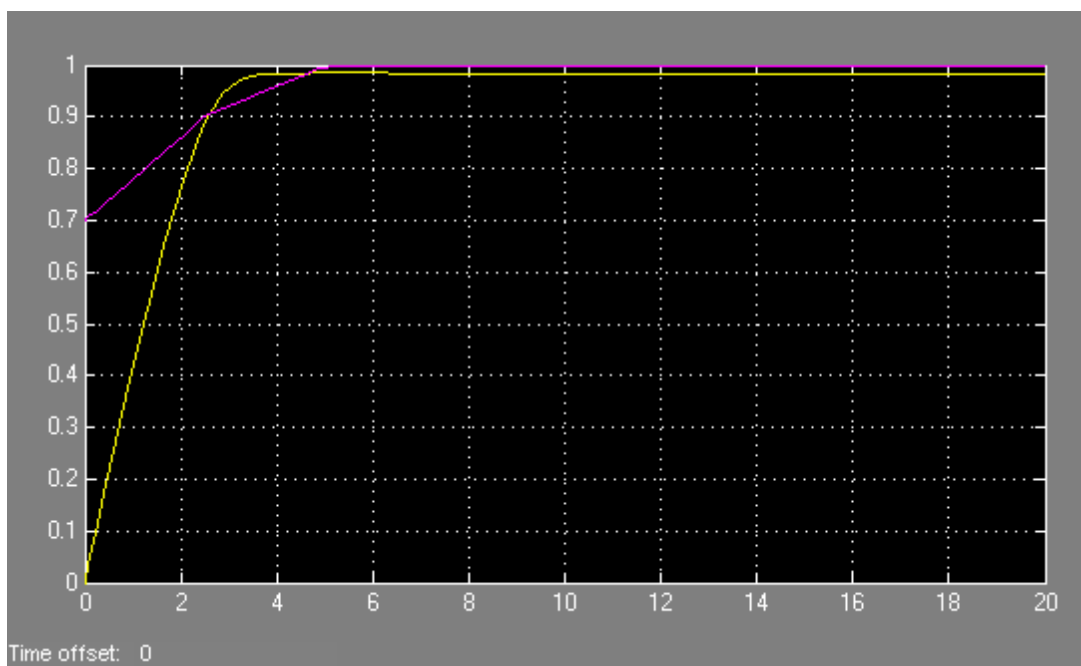
Σχήμα 6.2 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (Β), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.



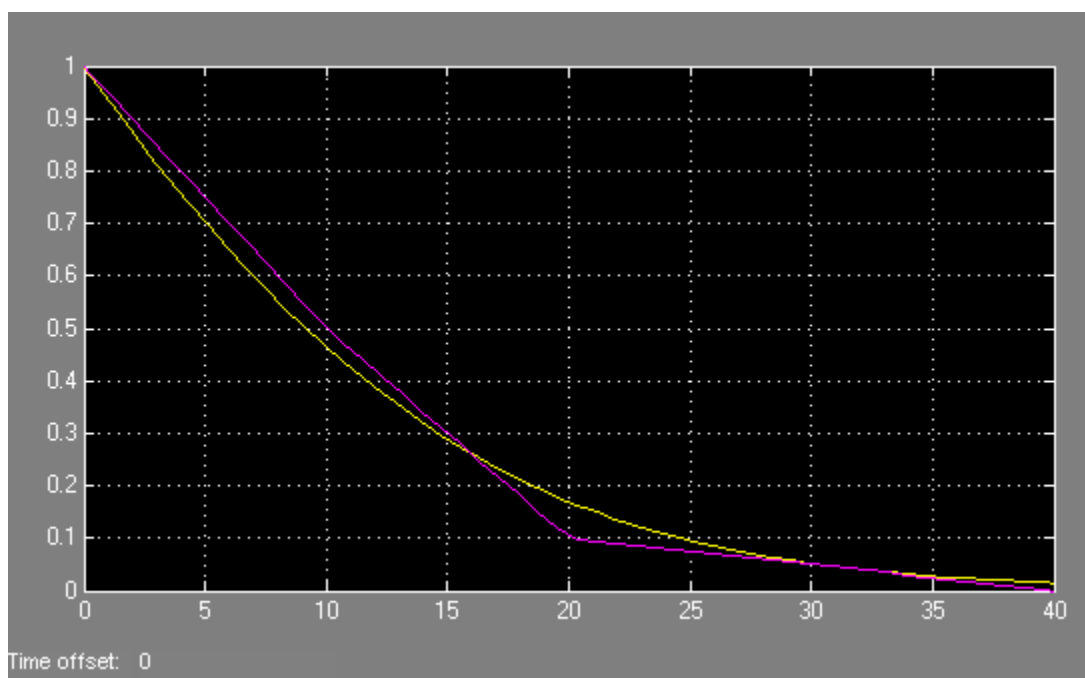
Σχήμα 6.3 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (C), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.



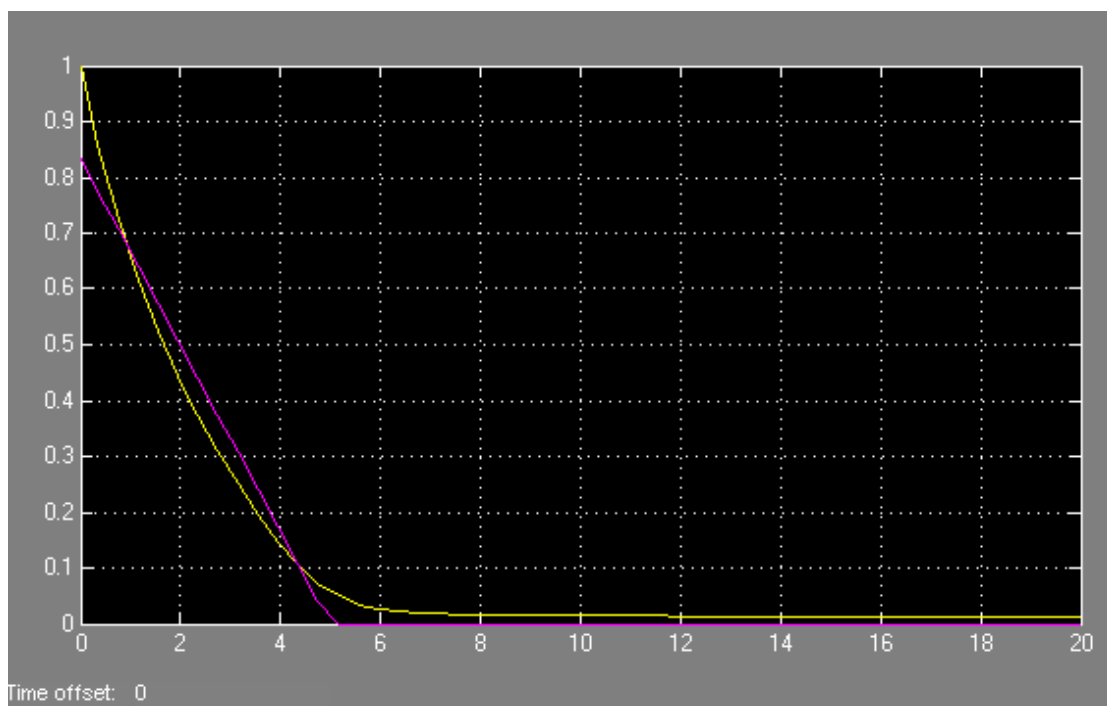
Σχήμα 6.4 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (D), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.



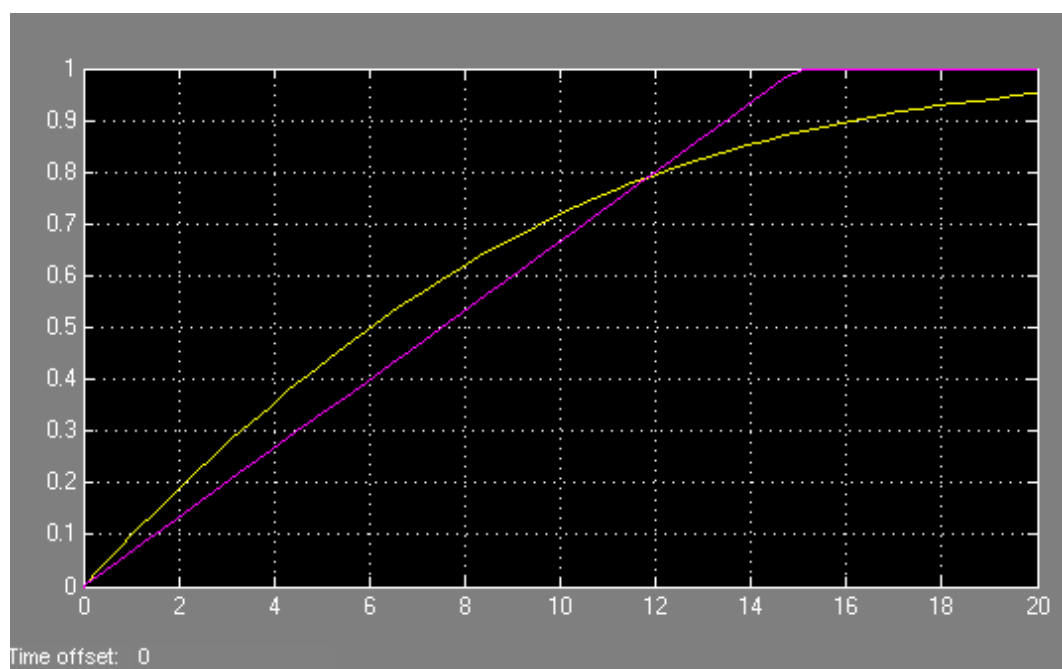
Σχήμα 6.5 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (E), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.



Σχήμα 6.6 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (F), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.



Σχήμα 6.7 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (G), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.



Σχήμα 6.8 Αποτέλεσμα προσομοίωσης με Simulink του πειράματος (B), μετά την εκτίμηση παραμέτρων.

6.2 ΜΗ ΓΡΑΜΜΙΚΑ ΕΛΑΧΙΣΤΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΑ

6.2.1 Ο αλγόριθμος

Ο αλγόριθμος εκτίμησης παραμέτρων που χρησιμοποιήσαμε είναι τα μη γραμμικά ελάχιστα τετράγωνα (nonlinear least squares). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για να προσαρμοστεί ένα μη γραμμικό μοντέλο στα δεδομένα. Ένα μη γραμμικό μοντέλο ορίζεται ως μια εξίσωση που είναι μη γραμμική στους συντελεστές, ή συνδυασμός γραμμικών και μη γραμμικών συντελεστών. Με διανυσματική μορφή, τα μη γραμμικά μοντέλα δίνονται από τον τύπο:

$$y = f(X, \beta) + \varepsilon$$

όπου

το y είναι ένα n -επί-1 διάνυσμα των αποκρίσεων.

το f είναι μια συνάρτηση του β και του X .

β είναι ένα m -επί-1 διάνυσμα των παραμέτρων.

X είναι το n -επί- m διάνυσμα σχεδίου για το μοντέλο.

ε είναι ένα n -επί-1 διάνυσμα των λαθών.

Τα μη γραμμικά μοντέλα είναι δυσκολότερο να προσαρμοστούν από τα γραμμικά μοντέλα επειδή οι παράμετροι δεν μπορούν να υπολογιστούν χρησιμοποιώντας τις απλές τεχνικές διανύσματος. Αντ' αυτού, απαιτείται μια επαναληπτική προσέγγιση που ακολουθεί αυτά τα βήματα:

1. Έναρξη με μια αρχική εκτίμηση για κάθε παράμετρο. Για μερικά μη γραμμικά μοντέλα, παρέχεται μια ευριστική προσέγγιση που παράγει τις λογικές αρχικές τιμές. Για άλλα μοντέλα, παρέχονται τυχαίες τιμές στο διάστημα $[0,1]$.
2. Παράγεται η προσαρμοσμένη καμπύλη για το τρέχον σύνολο παραμέτρων. Η προσαρμοσμένη τιμή απόκρισης \hat{y} δίνεται από τον τύπο:

$$\hat{y} = f(X, b)$$

και περιλαμβάνει τον υπολογισμό του Jacobian του $f(X, b)$, το οποίο ορίζεται ως ένα διάνυσμα των μερικών παραγώγων που λαμβάνονται σύμφωνα με τις παραμέτρους.

3. Ρυθμίζονται οι παράμετροι και καθορίζεται εάν η εκτίμηση είναι καλή. Η κατεύθυνση και το μέγεθος της ρύθμισης εξαρτώνται από τον αλγόριθμο προσαρμογής. Το Curve Fitting Toolbox παρέχει τους εξής αλγόριθμους:

- Trust-region - αυτός είναι ο προεπιλεγμένος αλγόριθμος και χρησιμοποιείται για μοντέλα μεγάλης κλίμακας εάν διευκρινίζονται περιορισμοί για τις παραμέτρους. Μπορεί να λύσει τα δύσκολα μη γραμμικά προβλήματα αποτελεσματικότερα από τους άλλους αλγόριθμους και αντιπροσωπεύει μια βελτίωση πέρα από το δημοφιλή αλγόριθμο Levenberg-Marquardt.
- Levenberg-Marquardt - αυτός ο αλγόριθμος έχει χρησιμοποιηθεί για πολλά έτη και έχει αποδείξει ότι δουλεύει τις περισσότερες φορές για ένα ευρύ φάσμα μη γραμμικών μοντέλων και αρχικών τιμών. Χρησιμοποιείται για μοντέλα μέσης κλίμακας.
- Gauss-Newton -- αυτός ο αλγόριθμος χρησιμοποιείται και αυτός για μοντέλα μέσης κλίμακας και είναι ενδεχομένως γρηγορότερος από τους άλλους αλγόριθμους, αλλά υποθέτει ότι τα υπόλοιπα είναι κοντά στο μηδέν. Συμπεριλαμβάνεται με την εργαλειοθήκη για παιδαγωγικούς λόγους και πρέπει να είναι η τελευταία επιλογή για τα περισσότερα μοντέλα και σύνολα στοιχείων.

4. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία με επιστροφή στο βήμα 2 μέχρι η προσαρμογή των τιμών να φθάσει στα διευκρινισμένα κριτήρια σύγκλισης.

Εφόσον λοιπόν το μοντέλο μας είναι μοντέλο μεγάλης κλίμακας (ο αριθμός των παραμέτρων που θέλουμε να υπολογίσουμε είναι μεγάλος), χρησιμοποιείται η μέθοδος trust-region.

6.2.2 Η μέθοδος trust-region

Πολλές από τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται στο Optimization Toolbox είναι βασισμένες σε trust-regions, μια απλή όμως ισχυρή έννοια στη βελτιστοποίηση. Για να καταλάβουμε την προσέγγιση της trust-region στη βελτιστοποίηση, θεωρούμε το πρόβλημα ελαχιστοποίησης χωρίς περιορισμούς, $\text{minimize } f(x)$, όπου η συνάρτηση παίρνει διανυσματικά ορίσματα και επιστρέφει αριθμούς. Υποθέτουμε ότι είμαστε σε ένα σημείο x στο n - διάστημα και θέλουμε να βρούμε ένα σημείο στο οποίο η συνάρτηση να έχει μια μικρότερη τιμή. Η βασική ιδέα είναι να προσεγγίσουμε την f με μια απλούστερη συνάρτηση q , που απεικονίζει εύλογα τη συμπεριφορά της συνάρτησης f σε μια γειτονιά (περιοχή) N γύρω από το σημείο x . Αυτή η περιοχή είναι η trust-region. Ένα δοκιμαστικό βήμα (trial step) s υπολογίζεται με ελαχιστοποίηση (ή περίπου ελαχιστοποίηση) μέσω του N . Αυτό είναι το υποπρόβλημα trust-region,

$$\min_s \{ q(s) \mid s \in N \} \quad (6.1)$$

Το τρέχον σημείο ενημερώνεται για να είναι $x+s$ εάν $f(x+s) < f(x)$ διαφορετικά, το τρέχον σημείο παραμένει αμετάβλητο και το N , η trust-region, μικραίνει και ο υπολογισμός δοκιμαστικών βημάτων επαναλαμβάνεται.

Οι ερωτήσεις κλειδί στον καθορισμό μιας συγκεκριμένης προσέγγισης trust-region για την ελαχιστοποίηση της $f(x)$ είναι πώς να επιλέξουμε και να υπολογίσουμε την προσέγγιση της q (που καθορίζεται στο τρέχον σημείο x), πώς να επιλέξουμε και να τροποποιήσουμε την trust-region N , και με πόση ακρίβεια θα λύσουμε το υποπρόβλημα trust-region.

Στην πρότυπη μέθοδο trust-region, η τετραγωνική προσέγγιση της q καθορίζεται από τους πρώτους δύο όρους της προσέγγισης Taylor της f στο x , η περιοχή N έχει συνήθως σφαιρική ή ελλειψοειδή μορφή. Από μαθηματική άποψη το υποπρόβλημα trust-region δηλώνεται χαρακτηριστικά :

$$\min \left\{ \frac{1}{2} s^T H s + s^T g \text{ such that } \|Ds\| \leq \Delta \right\} \quad (6.2)$$

πού g είναι η κλίση της f στο τρέχον σημείο x , H είναι το Hessian διάνυσμα (το συμμετρικό διάνυσμα των δευτέρων παραγώγων), D είναι ένα διαγώνιο βαθμωτό διάνυσμα, Δ είναι ένας θετικός αριθμός, και $\|\cdot\|$ είναι η δεύτερη νόρμα. Υπάρχουν καλοί αλγόριθμοι για την επίλυση της (6.2), τέτοιοι αλγόριθμοι περιλαμβάνουν χαρακτηριστικά τον υπολογισμό ενός πλήρους ιδιοσυστήματος και μιας διαδικασίας Newton που εφαρμόζονται στην εξίσωση

$$\frac{1}{\Delta} - \frac{1}{\|s\|} = 0$$

Τέτοιοι αλγόριθμοι παρέχουν μια ακριβή λύση για την Εξ. (6.2). Εντούτοις, απαιτούν χρόνο ανάλογο προς διάφορες παραγοντοποιήσεις του H . Επομένως, για τα προβλήματα μεγάλης κλίμακας απαιτείται μια διαφορετική προσέγγιση. Διάφορες προσεγγίσεις και ευριστικές στρατηγικές, βασισμένες στην Εξ. (6.2), έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία. Η διαδικασία προσέγγισης που ακολουθείται στο Optimization Toolbox είναι να περιοριστεί το υποπρόβλημα trust-region σε ένα δισδιάστατο υποδιάστημα S . Μόλις υπολογιστεί το υποδιάστημα S , η δουλειά για να λυθεί η Εξ. (6.2) είναι τετριμμένη ακόμα κι αν απαιτούνται πλήρεις πληροφορίες για ιδιοτιμές/ιδιοδιανύσματα (δεδομένου ότι στο υποδιάστημα, το πρόβλημα είναι μόνο δισδιάστατο). Η κυρίαρχη εργασία έχει μετατοπιστεί τώρα στον προσδιορισμό του υποδιαστήματος.

Το δισδιάστατο υποδιάστημα S καθορίζεται με την βοήθεια μιας προϋποτεθειμένης συζευγμένης διαδικασίας βαθμωτού διανύσματος που περιγράφεται κατωτέρω. Η εργαλειοθήκη ορίζει $S = \langle s_1, s_2 \rangle$, όπου το s_1 είναι στην κατεύθυνση του διανύσματος g , και το s_2 είναι είτε μια κατά προσέγγιση κατεύθυνση Newton, δηλ., μια λύση της

$$H \cdot s_2 = -g \quad (6.3)$$

ή μια κατεύθυνση της αρνητικής κυρτότητας,

$$s_2^T \cdot H \cdot s_2 < 0 \quad (6.4)$$

Η φιλοσοφία πίσω από αυτήν την επιλογή s είναι να επιβάλουμε ολική σύγκλιση (μέσω της πιο απότομης κατεύθυνσης καθόδου ή της κατεύθυνσης αρνητικής κυρτότητας) και να επιτύχουμε γρήγορη τοπική σύγκλιση (μέσω του βήματος Newton, όταν υπάρχει).

Ένα πλαίσιο για την προσέγγιση του Optimization Toolbox στην χωρίς περιορισμούς ελαχιστοποίηση χρησιμοποιώντας ιδέες trust-region είναι τώρα εύκολο να περιγραφεί:

- Διατυπώνουμε το δισδιάστατο υποπρόβλημα trust-region.
- Λύνουμε την Εξ. (6.2) για να καθορίσουμε το δοκιμαστικό βήμα s .
- Εάν $f(x+s) \leq f(x)$ τότε $x = x + s$.
- Ρυθμίζουμε το Δ .

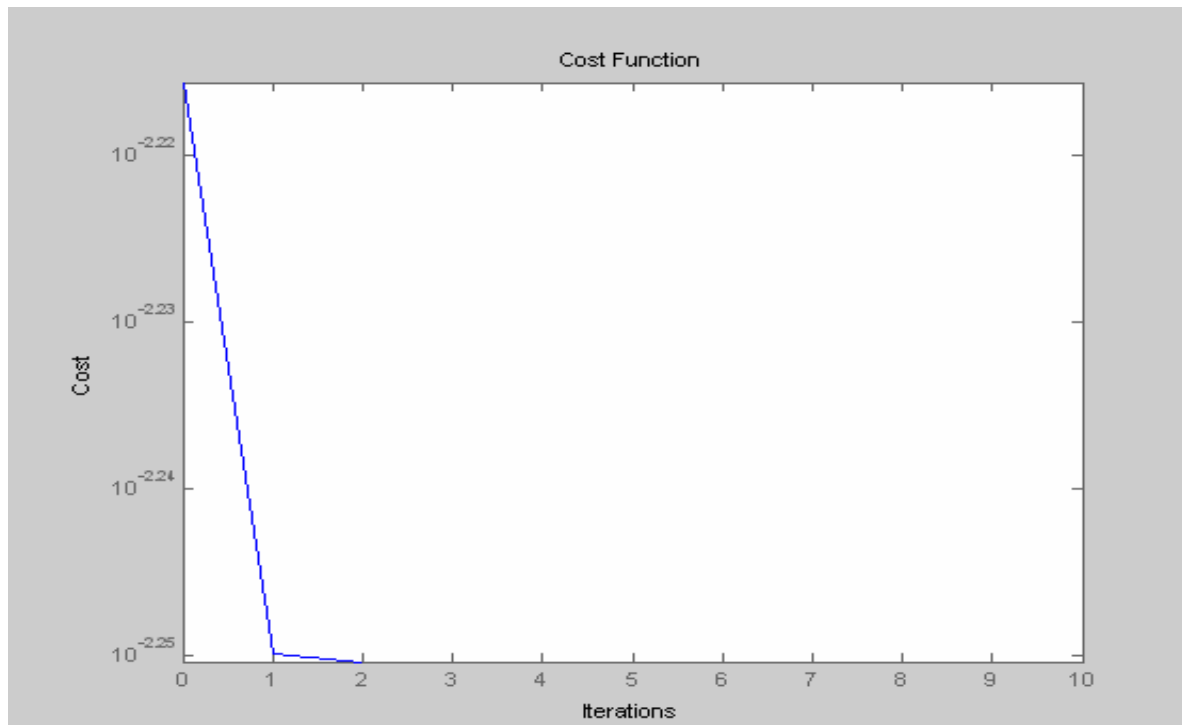
Αυτά τα τέσσερα βήματα επαναλαμβάνονται μέχρι τη σύγκλιση. Η trust-region διάσταση Δ ρυθμίζεται σύμφωνα με πρότυπους κανόνες. Ειδικότερα, μειώνεται εάν το δοκιμαστικό βήμα δεν γίνεται αποδεκτό, δηλ., $f(x+s) \geq f(x)$.

6.3 ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

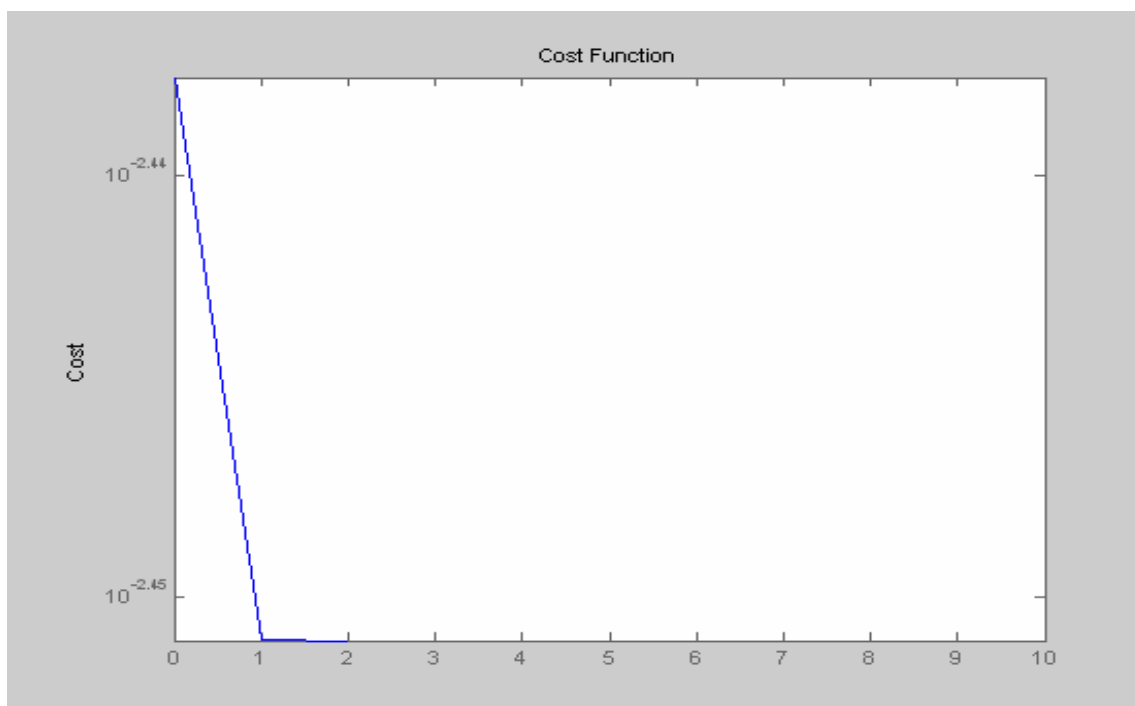
Για να γίνουν οι εκτιμήσεις σε κάθε πείραμα επιλέγαμε αρχικά όλες τις παραμέτρους που μας ενδιέφεραν. Κατόπιν παίρναμε σύνολα τιμών δοκιμάζοντας όλους τους solvers του Simulink Parameter Estimation. Από αυτές τις δοκιμές καταλαβαίναμε από ποιο πείραμα θα υπολογιστεί η κάθε παράμετρος. Έτσι η αρχική τιμή κάθε παραμέτρου έχει υπολογιστεί από ένα πείραμα κάθε φορά και η τιμή της έπειτα δοκιμάστηκε και στα υπόλοιπα πειράματα για να διαπιστώσουμε όντως τη βελτιστοποίηση του συνόλου τιμών. Έπειτα δοκιμάσαμε όλους τους αλγόριθμους του Simulink Parameter Estimation για να βρούμε αυτόν που θα μας δώσει τα βέλτιστα αποτελέσματα. Ο αλγόριθμος gradient descent μας έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, αλλά ήταν αρκετά αργός παρόλο που δεν έγιναν πολλές επαναλήψεις. Ο

αλγόριθμος nonlinear least-squares μας έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε λιγότερο χρόνο εκτέλεσης. Ο αλγόριθμος pattern search ήταν σχετικά αργός και έκανε το μεγαλύτερο αριθμό επαναλήψεων από τους υπόλοιπους για να πάρουμε τελικά παρόμοια αποτελέσματα με τον αλγόριθμο gradient descent. Ο αλγόριθμος simplex search ήταν αρκετά γρήγορος, αλλά σε κάποια πειράματα δεν μας έδινε καθόλου καλά αποτελέσματα.

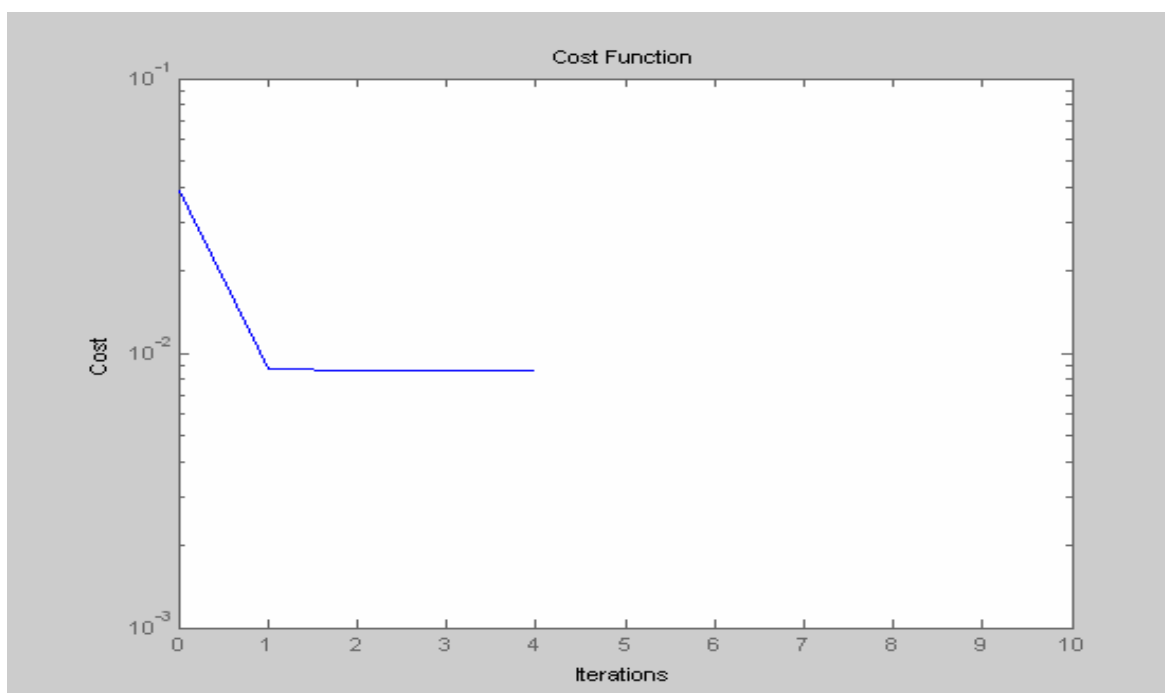
Τελικό κριτήριο για την επιλογή του αλγορίθμου ήταν η τιμή της συνάρτησης κόστους, όπου για τον αλγόριθμο nonlinear least-squares είχαμε πιο επιθυμητά αποτελέσματα. Οι συναρτήσεις κόστους της εκτίμησης των παραμέτρων που παρατίθενται παρακάτω (Σχήματα 6.9-6.14) βλέπουμε ότι συγκλίνουν σε μια ελάχιστη τιμή, οπότε πράγματι η βελτιστοποίηση που κάναμε ήταν επιτυχής. Τέλος, αν είχαμε και ένα δεύτερο σύνολο πειραματικών στοιχείων, μετά την ολοκλήρωση της εκτίμησης, θα μπορούσαμε να επικυρώσουμε τα αποτελέσματά μας ενάντια σε αυτό.



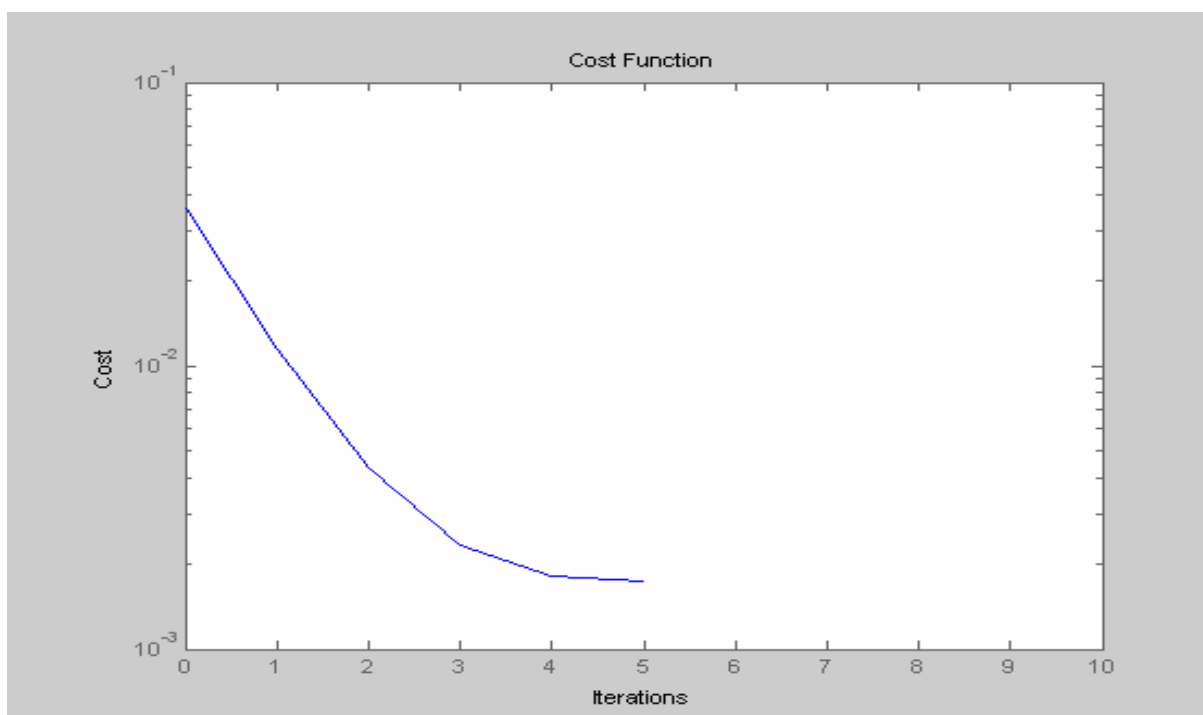
Σχήμα 6.9 Η συνάρτηση κόστους της παραμέτρου v_d



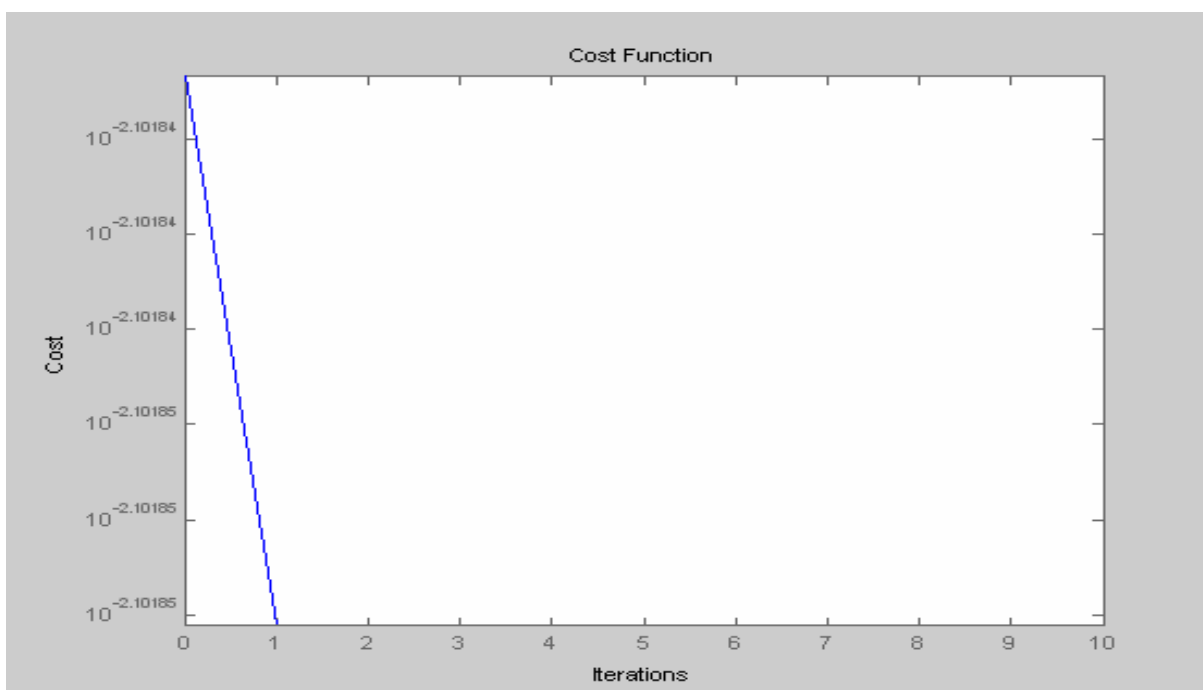
Σχήμα 6.10 Η συνάρτηση κόστους της παραμέτρου v''_d



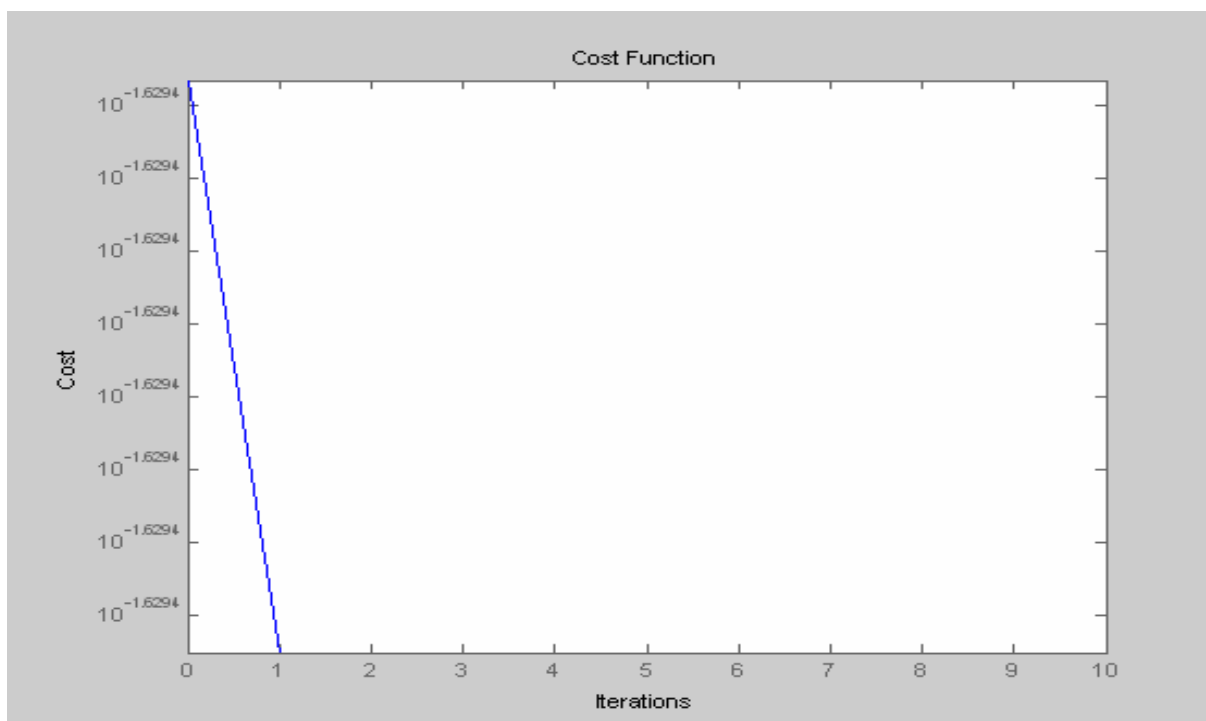
Σχήμα 6.11 Η συνάρτηση κόστους της παραμέτρου r_d



Σχήμα 6.12 Η συνάρτηση κόστους της παραμέτρου v'_w



Σχήμα 6.13 Η συνάρτηση κόστους της παραμέτρου v''_w



Σχήμα 6.14 Η συνάρτηση κόστους της παραμέτρου r_w

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η προσομοίωση και η εκτίμηση των παραμέτρων του μοντέλου Xenopus με τη βοήθεια του Simulink ήταν επιτυχείς. Αφενός γιατί, το μοντέλο προσομοιώθηκε πλήρως και με μεγάλη ευκολία και αφετέρου γιατί, οι υπολογισμένες τιμές επαληθεύουν το αρχικό μοντέλο εξισώσεων και οι συναρτήσεις κόστους των αποτελεσμάτων συγκλίνουν σε μια ελάχιστη τιμή.

Από την άλλη, όμως, για να μελετηθούν ρεαλιστικά μοντέλα για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, πρέπει να προστεθούν περισσότερα συστατικά στο μοντέλο και να ενσωματωθούν και άλλα μετρήσιμα φαινόμενα στη συνάρτηση κόστους. Όσο αυξάνεται η αξιοπιστία της μοντελοποίησης, οι μαθηματικές και υπολογιστικές περιπλοκές του προβλήματος αυξάνονται γρήγορα. Θα απαιτηθούν αποτελεσματικά και ακριβή εργαλεία για την εκτίμηση παραμέτρου και για τη δημιουργία υπολογιστικών μοντέλων των σύνθετων δικτύων ελέγχου που λειτουργούν μέσα στα κύτταρα, ο οποίος είναι ένας από τους κύριους στόχους της βιοπληροφορικής στη μεταγονιδιακή εποχή.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Aclara (2004), BioSciences Inc. Realizing the Promise of Personalized Medicine, Industry Overview.
- [2] Bray D. (1995), "Protein molecules as computational elements in living cells", *Nature* 376, 307-12.
- [3] Brutlag D. L., Galper A. R., and Millis D. H. (1991), "Knowledge based simulation of DNA metabolism: prediction of enzyme action", *Comput. Appl. Biosci.* 7, 9-19.
- [4] Clark P. David, Russell D. Lonnie (2000), "MOLECULAR BIOLOGY made simple and fun", Vol. 2, page 25-203.
- [5] Gillespie D. T. (1977), "Exact Stochastic Simulation of Coupled Chemical Reactions", *J. Phys. Chem.* 81, 2340-61.
- [6] Hanahan Douglas and Weinberg A. Robert (2000), *The Hallmarks of Cancer*, *Cell*, Vol. 100, 57–70, January 7.
- [7] Hartwell L.H., Hopfield J.J., Leibler S. and Murray A.W. (1999), "From molecular to modular cell biology", *Nature*, 402, pp. C47-C52.
- [8] Hofstadt R. and Thelen S. (1998), "Quantitative modeling of biochemical networks", In. *Silico. Biol.* 1, 39-53.
- [9] <http://jigcell.biol.vt.edu/frogeggUC.html>.
- [10] <http://jigcell.biol.vt.edu/FEbio.html>.
- [11] Kholodenko B.N., J.B. Hoek, Westerhoff H.V., and Brown G.C. (1997), "Quantification of information transfer via cellular signal transduction pathways", *FEBS Letters* 414, 430-4.
- [12] Lodish, "Molecular Cell Biology", Figure 13-1
- [13] Niehrs Christof, Birchmeier Walter (2005), "Signaling Pathways, Cell Biology and Cancer in the HGF ", Division of Molecular Embryology, HGF Association.
- [14] Pawan K. Dhar, Hao Zhu, Chee Meng Tan, Sandeep Somani, Ye Li, Santosh K. Mishra (2004), "Modeling and Simulation in Systems Biology: The Genesis and Evolution of Challenges, Strategies and Methods", Bioinformatics Institute of Singapore, 6 June.

- [15] Solomon M.J., Glotzer M., Lee T.H., Philippe M., Kirschner M.W. (1990), "Cyclin activation of p34cdc2".
- [16] Sontag D. Eduardo (2004), "Some new directions in control theory inspired by Systems Biology".
- [17] Sontag D. Eduardo (2005), "Molecular Systems Biology and Dynamics: An Introduction for non-Biologists".
- [18] <http://www.systems-biology.org>.
- [19] Thieffry D. and Romero D. (1999), "The modularity of biological regulatory networks", *Biosystems* 50, 49-59.
- [20] <http://www.usm.maine.edu>.
- [21] Wolkenhauer Olaf, Kitano Hiroaki, and Cho Kwang-Hyun (2003), "Systems Biology: Looking at opportunities and challenges in applying systems theory to molecular and cell biology".
- [22] <http://www.wellcome.ac.uk>.
- [23] Wikipedia, the free encyclopedia.
- [24] <http://www.xenbase.org/intro.html>
- [25] Zwolak W. Jason (2003), "Parameter Estimation in Biological Cell Cycle Models using Deterministic Optimazation" Diploma thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- [26] Zwolak W. Jason, Tyson J. John, and Watson T. Layne (2005), "Parameter Estimation for a Mathematical Model of the Cell Cycle in Frog Eggs", *Journal of Computational Biology*, Volume 12, Number 1, pp. 48-63.
- [27] Zwolak W. Jason, Tyson J. John, and Watson T. Layne (2005), "Globally optimised parameters for a model of mitotic control in frog egg extracts", *IEE Proc. –Syst. Biol.*, Volume 152, No 2, June 2005

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

Αυτός ο πίνακας περιέχει τα στοιχεία που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση παραμέτρου του μοντέλου Xenopus [25].

Πίνακας Α.1: Πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στο διαφορικό μοντέλο

Data	Reference	Description
(0.20,45) (0.25,40) (0.30,30) (0.50,20)	Private communication with Moore, [1997]	(Total Cyclin, Time Lag) Time lags for MPF activation.
(0,0.18) (0,3)	Private communication with Moore, [1997]	(Dummy,Threshold/Threshold Ratio) Thresholds for MPF activation and inactivation
(2,0.75) (4,0.51) (8,0.21)	Figure 4.b. from Kumagai and Dunphy, [1995]	(Time, Inactive MPF) MPF activation during M-phase
(2,1.0) (4,1.0) (8,0.85)	Figure 4.b. from Kumagai and Dunphy, [1995]	(Time, Inactive MPF) MPF activation during interphase
(4,0) (16,0)	Figure 3.c. from Kumagai and Dunphy, [1995]	(Time, Inactive MPF) MPF inactivation during M-phase
(2,1) (4,1) (16,1)	Figure 3.c. from Kumagai and Dunphy, [1995]	(Time, Inactive MPF) MPF inactivation during interphase
(1.25,0.8) (2.5,0.9) (5,1) (10,1)	Figure 10. from Kumagai and Dunphy, [1992]	(Time, Active Cdc25) Cdc25 activation
(5,0.75) (10,0.5) (20,0.1) (40,0)	Figure 10. from Kumagai and Dunphy, [1992]	(Time, Active Cdc25) Cdc25 inactivation

Πίνακας Α.1: Πειραματικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν στο διαφορικό μοντέλο

Data	Reference	Description
(2,0.5) (5,0) (7,0) (10,0)	Figure 2. from Tang et al, [1993]	(Time, Active Weel) Weel inactivation
(7.5,0.5) (15,1)	Figure 2. from Tang et al, [1993]	(Time, Active Weel) Weel activation