

УДК: 51-76

Редукция модели CD95-индуцируемого апоптоза

©2012 Кутумова Е.О.*¹

¹Конструкторско-технологический институт вычислительной техники,
Сибирское отделение Российской академии наук, Новосибирск, 630090, Россия

Аннотация. В работе рассмотрена математическая модель CD95-индуцируемой регуляции запрограммированной клеточной гибели – апоптоза. На основании методов редукции при помощи программного комплекса BioUML построена модель, содержащая минимальное количество компонентов и способная воспроизводить с достаточной точностью динамику исходной модели. Полученные результаты будут использованы для оптимизации комплексной модели апоптоза, включающей сигнальный путь рецептора CD95. Данный подход позволяет значительно упростить процесс моделирования сложных биологических систем и расширить область исследований *in silico*.

Ключевые слова: математическое моделирование, редукция модели, CD95-индуцируемый апоптоз, BioUML.

ВВЕДЕНИЕ

Апоптоз – генетически запрограммированная гибель клеток – один из объектов интенсивного исследования в области системной биологии. Этот процесс регулирует качественный и количественный состав тканей многоклеточного организма, и его нарушение тесно связано с рядом патологий, включающих развитие рака [1].

Апоптоз запускается внутренними или внешними сигналами, источниками которых являются клеточные структуры в первом случае, и так называемые «рецепторы смерти», расположенные на поверхности клеток, во втором. Одним из таких рецепторов является CD95 (APO-1/Fas). Его стимуляция природным лигандом CD95L или агонистическими антителами, такими как anti-APO-1, приводит к формированию сигнального комплекса DISC, включающего олигомеризованный белок CD95, Fas-ассоциированный домен смерти (FADD), прокаспазы-8 и -10, а также две изоформы клеточного белка FLIP (cFLIP long и cFLIP short) [2]. В комплексе DISC происходит активация каспазы-8, которая способствует расщеплению эффекторных прокаспаз-3, -6 и -7 напрямую, что характерно для клеток первого типа, или посредством активации цитозольного белка Bid с последующим выделением цитохрома C и Smac из митохондрий, формированием апоптосомного комплекса и активацией каспазы-9 в клетках второго типа. Каспазы-3 и -7 запускают расщепление поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP), после чего процесс апоптоза становится необратимым.

М. Bentele и соавт. [3] построили математическую модель регуляции CD95-индуцируемого апоптоза, которая описывает изложенные выше белковые взаимодействия в терминах нелинейных дифференциальных уравнений, полученных на основе закона действующих масс и кинетики Михаэлиса–Ментен. Для валидации параметров модели авторы использовали данные Вестерн-блот анализа, устанавливающего динамику изменения уровня концентрации ряда белков. Однако количество параметров и переменных модели значительно превышает объем

*elena.kutumova@biouml.org

экспериментальных данных, принимаемых во внимание. В данной работе на основе методов редукции [4] найдена модель с минимальным числом параметров и переменных, воспроизводящая динамику этих данных, а также описаны ее свойства.

Анализ, симуляция и редукция модели проводились с использованием программного комплекса BioUML (<http://www.biouml.org>).

КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ АПОПТОЗА, ИНДУЦИРУЕМОГО РЕЦЕПТОРОМ CD95

Математическая модель M. Ventele и соавт. (рис. 1.A) содержит набор белков $S = (S_1, S_2, \dots, S_m)^T$, $m = 42$, которым сопоставлены переменные $C = (C_1, C_2, \dots, C_m)$, задающие их концентрации, и набор биохимических реакций (табл. 1) со скоростями $v = (v_1, v_2, \dots, v_n)^T$, $n = 78$, которые зависят от кинетических констант. Скорости реакций вычисляются согласно одному из следующих правил.

1. Для мономолекулярных реакций вида $S \rightarrow P$ (за исключением реакций высвобождения цитохрома C и Smac из митохондрий, кинетика которых описана ниже) и бимолекулярных реакций вида $S_1 + S_2 \rightarrow P$ кинетические уравнения задаются функциями на основе закона действующих масс: $k \cdot C_S$ и $k \cdot C_{S_1} \cdot C_{S_2}$ соответственно, где k – кинетическая константа.
2. Скорости реакций вида $S + M \rightarrow P$, описывающих превращение реактанта S в продукт P под действием модификатора M , определяются на основе кинетики Михаэлиса–Ментен по формуле $k \cdot C_S \cdot C_M / (K_m + C_S)$ с константами k и K_m .

Реакции деградации белков $S \rightarrow \emptyset$ моделируются с помощью экспоненциально убывающей функции, зависящей от активности эффекторных каспаз, которая представляется в виде виртуальной переменной $x_{apop\ activity}$:

$$\frac{dx_{apop\ activity}}{dt} = \frac{(1 - x_{apop\ activity})(k_{36}C_{casp3} + k_{36}C_{casp6} + k_7C_{casp7})}{Km_{367} + (1 - x_{apop\ activity})} - k_{degrad\ death} \cdot x_{apop\ activity}, \quad (1)$$

где k_{36} , k_7 и Km_{367} – константы. Скорость реакции в этом случае задается функцией $f_{degrad}(x_{apop\ activity}) \cdot C_S$, где $f_{degrad}(x_{apop\ activity})$ определяется выражением $k_{degrad} \cdot x_{apop\ activity}^2 + k_{degrad\ steady}$ для всех активных каспаз и комплексов, содержащих продукты их расщепления, является константой $k_{degrad\ PARP}$ для молекулы cPARP и равна $k_{degrad} \cdot x_{apop\ activity}^2$ для остальных белков (k_{degrad} и $k_{degrad\ steady}$ – константы).

Для описания поведения модели во времени используется система дифференциальных уравнений (ОДУ) и дискретных событий. ОДУ представляет собой линейную комбинацию скоростей реакций v :

$$\frac{dC}{dt} = N \cdot v, \quad (2)$$

где N – стехиометрическая матрица $n \times m$.

Для валидации параметров модели авторы провели Вестерн-блот анализ ряда белков (Bid, tBid, PARP, cPARP, прокаспазы-2, -3, -7, -8, -9 и продукты их расщепления) после стимуляции рецептора агонистическими антителами anti-CD95 с начальной концентрацией 5 мкг/мл и 200 нг/мл (быстрый и медленный сценарии активации каспаз соответственно). Полученные экспериментальные данные представляют собой наборы точек, фиксирующие значения концентраций белков в заданные промежутки времени. Для воспроизведения динамики этих данных в текущей работе в исходную модель были внесены следующие изменения. Значения кинетических констант для всех бимолекулярных реакций были умножены на параметр

$5 \cdot 10^{-5}$. Значения констант деградации ($k_{deg,rad}$) для быстрого и медленного сценария активации каспаз были установлены равными 3.56 мин^{-1} и 0.62 мин^{-1} соответственно.

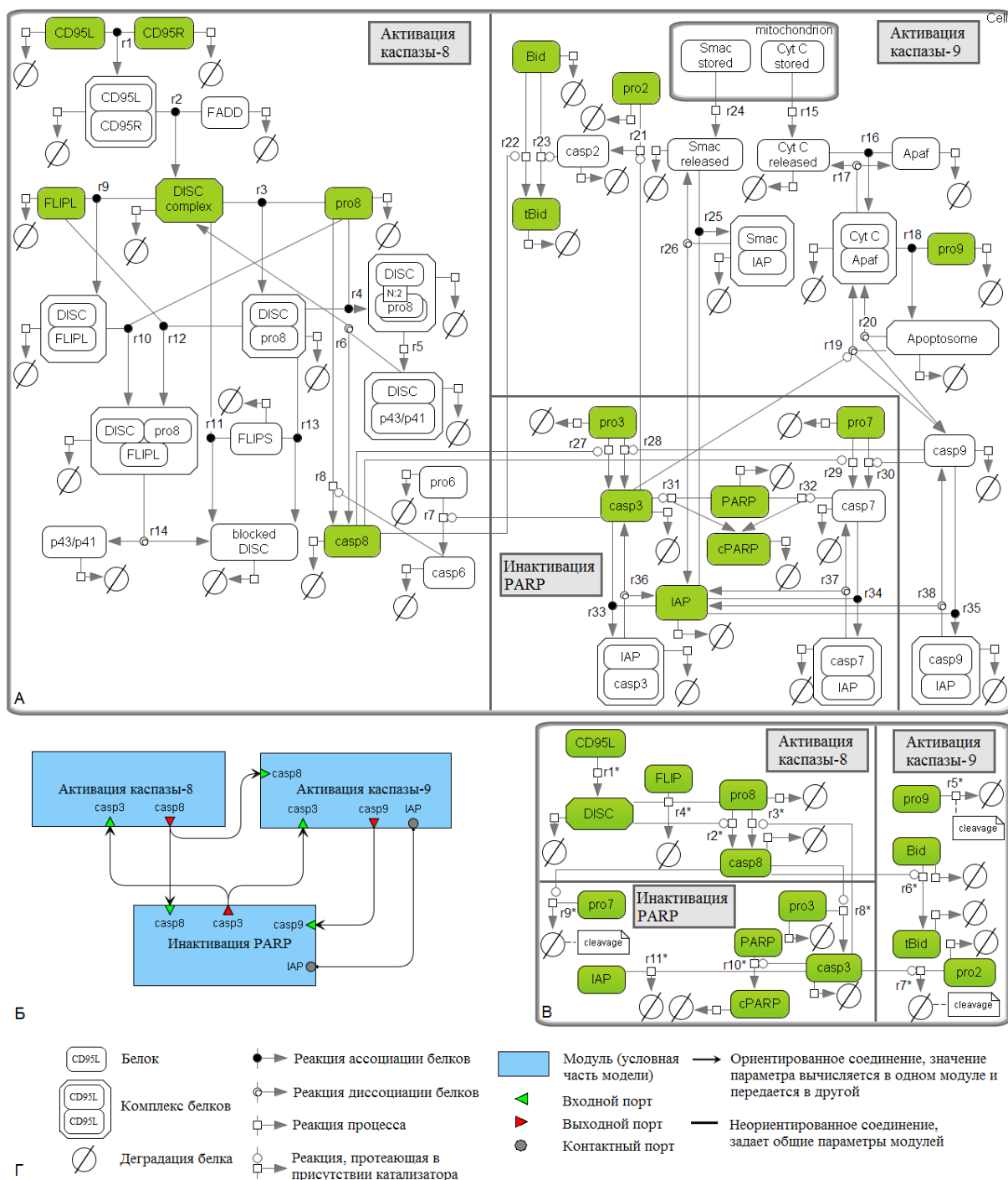


Рис. 1. Модель регуляции апоптоза рецептором CD95 и результаты ее редукции. **А.** Исходная модель, разделенная на модули в соответствии с тремя этапами апоптоза – активацией каспаз-8, -9 и инактивацией PARP. **Б.** Модульное представление модели. **В.** Минимальная модель, полученная в результате редукции. **Г.** Графическая нотация, используемая для представления моделей А–В.

С помощью дискретного события в модели описан процесс высвобождения цитохрома С и Smac из митохондрий, которое происходит в течение 7 минут сразу после того, как концентрация активного белка tBid (truncated Bid) достигает уровня концентрации ингибиторов Bcl-2/Bcl-XL. Функция высвобождения соответствует

В-сплайну [3], в основе которого лежат экспериментальные наблюдения, и повторяет поведение сигмоидной функции

$$f_{release}(t) = 1 - \frac{1}{1 + \exp(k_{contr} \cdot (-t + t_{trigger} + 0.5 \cdot t_{release}))}, \quad (3)$$

где $t_{trigger}$ обозначает время, когда концентрация tBid достигает концентрации Bcl-2/Bcl-XL, $t_{release}$ – время высвобождения цитохрома C и Smac, а k_{contr} – некоторый коэффициент сжатия.

МЕТОДЫ РЕДУКЦИИ МОДЕЛИ

Построение аппроксимации модели или ее редукция подразумевает преобразование системы (2) в систему более низкого порядка. При этом экспериментальная динамика переменных $C_{i_1}, C_{i_2}, \dots, C_{i_s}$ вектора C , которая определяется набором точек, фиксирующих значения переменных в заданные промежутки времени $t_j, j = 1, \dots, r$, должна сохраняться. Для проверки этого факта в ходе редукции модели мы вычисляем значение функции расстояний

$$f_{dist} = \sum_{i,j} \omega_i \cdot (C_{pred}(i, j) - C_{exp}(i, j))^2, \quad i = 1, \dots, s, \quad j = 1, \dots, r, \quad (4)$$

где C_{exp} и C_{pred} соответствуют экспериментальным и полученным в ходе симуляции значениям переменных, а веса $\omega_i = (\sum_j C_{exp}^2(i, j))^{-1/2}$ учитываются для того, чтобы все переменные имели одинаковую значимость.

Минимальной аппроксимацией модели мы будем называть модель с минимальным числом элементов (белков и реакций), для которой значение функции (4) превышает исходное значение не более чем на 15%.

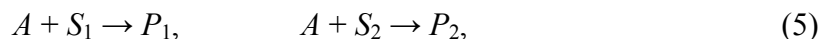
Существует ряд методов, направленных на снижение порядка системы дифференциальных уравнений [4]. Рассмотрим методы, непосредственно используемые в данной работе для редукции исходной модели регуляции апоптоза.

Квазистойчивая аппроксимация модели [5] подразумевает деление всех переменных, задающих концентрации белков, на две группы: “медленные” или базовые переменные C^s и “быстрые” переменные C^f , определяющие короткоживущие белки. Предполагается, что значение быстрых переменных много меньше значения медленных, а скорости образования и распада соответствующих белков имеют один порядок. Записывая систему (2) в виде двух подсистем для концентраций C^s и C^f

$$\frac{dC^s}{dt} = N^s \cdot v^s, \quad \frac{dC^f}{dt} = N^f \cdot v^f,$$

мы можем рассмотреть аппроксимацию $N^f \cdot v^f \approx 0$. Таким образом, последовательность реакций $S \rightarrow I \rightarrow P$, где I – короткоживущий белок, может быть приведена к виду $S \rightarrow P$.

Метод объединения (lumping analysis) позволяет сократить число переменных системы посредством объединения некоторых белков. Примером этого является система реакций, протекающих с одинаковой скоростью



где скорости реакций определяются как $k_1 \cdot C_A \cdot C_{S_1}$ и $k_2 \cdot C_A \cdot C_{S_2}$, соответственно, причем $k_1 = k_2$ и $C_{S_1}(t) = C_{S_2}(t)$. В этом случае систему (5) можно заменить одной реакцией



где $C_S(t) = C_{S_1}(t) = C_{S_2}(t)$, $C_P(t) = C_{P_1}(t) = C_{P_2}(t)$ и кинетическая константа $k = k_1 = k_2$.

Удаление очень медленных реакций. Мы будем говорить, что одна реакция протекает гораздо медленнее другой, т. е. $v_{i_1} \ll v_{i_2}$, если $\max_t |v_{i_1}(t)| < 10^{-2} \cdot \max_t |v_{i_2}(t)|$. В случае, когда некоторое подмножество реакций протекает гораздо медленнее всех реакций, включающих реагенты и продукты из этого подмножества, мы будем им пренебрегать.

Упрощение уравнений с кинетикой Михаэлиса–Ментен. Как отмечалось выше, уравнение Михаэлиса–Ментен для вычисления скорости реакции v имеет вид

$$v = \frac{k \cdot C_S \cdot C_M}{K_m + C_S}. \quad (6)$$

Заметим, что если $K_m \gg C_s$, то уравнение (6) можно привести к виду $k / K_m \cdot C_s \cdot C_M$. Если же $C_s \gg K_m$, то (6) заменяется уравнением $k \cdot C_M$.

Для упрощения анализа исходная модель регуляции апоптоза была разделена на модули (рис. 1Б) в соответствии с тремя промежуточными этапами апоптоза – активацией каспаз-8, -9 и инактивацией PARP. После этого при использовании программного комплекса BioUML каждый из модулей был редуцирован на основании методов, перечисленных выше.

Прежде чем перейти к рассмотрению всех модулей, обратимся к уравнению (1), определяющему скорость изменения виртуальной переменной $x_{apop\ activity}$ и, следовательно, скорость деградации всех белков модели. Заметим, что константа Михаэлиса $K_{m367} \gg (1 - x_{apop\ activity})$. При этом $k_7 \cdot C_{casp7} \gg k_{36} \cdot C_{casp3} > k_{36} \cdot C_{casp6}$ и уровень концентрации каспазы-7 может быть аппроксимирован линейной функцией от уровня концентрации каспазы-3:

$$C_{casp7} \approx a \cdot C_{casp3}, \quad \text{где } a = 0.18. \quad (7)$$

Поэтому мы можем упростить уравнение (1):

$$\frac{dx_{apop\ activity}}{dt} = \frac{(k_{36} + 0.18 \cdot k_7)}{K_{m367}} \cdot (1 - x_{apop\ activity}) \cdot C_{casp3} - k_{degrad\ death} \cdot x_{apop\ activity} \cdot$$

РЕДУКЦИЯ МОДЕЛИ АПОПТОЗА

1. Модуль активации каспазы-8

Путь активации каспазы-8 включает 19 белков и 14 реакций, которые можно разделить на три группы – расщепление прокаспазы-8 в составе комплекса DISC и под действием каспазы-3, а также ингибирование комплексов, включающих DISC, посредством cFLIP и cFLIPS (табл. 1, рис. 1А, r1-r14).

Анализируя квазиустойчивые состояния в первой группе реакций (r1-r5), мы находим короткоживущие комплексы CD95R:CD95L, DISC:pro8, DISC:pro8₂ и DISC:p43/p41. Удаляя их из модели, мы выделяем две основные реакции – быстрое формирование комплекса DISC (табл. 1, рис. 1Б, r1*) и более медленный процесс активации каспазы-8 внутри этого комплекса (r2*).

Заметим, что деградация CD95L, CD95R и белков cFLIP при заданных значениях кинетических параметров не оказывает значительного влияния на скорости остальных реакций модуля. Поэтому, пренебрегая этой деградацией, мы получаем следующий закон сохранения:

$$C_{CD95L} - C_{CD95R} = L_0 - R_0,$$

где L_0 и R_0 – начальные концентрации лиганда и рецептора соответственно.

Таблица 1. Список исходных реакций модели M. Bentele и соавт. (без учета реакций деградации белков) и соответствующие им реакции редуцированной модели

Исходная модель			Редуцированная модель	
№	Реакции (Кинетика) ¹	Порядок скорости ²	№	Реакции (Кинетика)
Активация каспазы-8, индуцированная CD95				
r1	CD95L + CD95R → CD95R:CD95L (МК)	10 ¹ /10 ⁰	r1*	CD95L → DISC ($k_{LR} \cdot C_{CD95R} \cdot C_{CD95L}$, C_{CD95R} определяется по формуле (8))
r2	FADD + CD95R:CD95L → DISC (МК)	10 ¹ /10 ⁰		
r3	pro8 + DISC → DISC:pro8 (МК)	10 ⁰ /10 ⁻¹		
r4	pro8 + DISC:pro8 → DISC:pro8 ₂ (МК)	10 ⁰ /10 ⁻¹	r2*	pro8 –DISC → casp8 ($k_{DISC_pro8} \cdot C_{pro8} \cdot C_{DISC}$)
r5	DISC:pro8 ₂ → DISC:p43/p41 (МК)	10 ⁰ /10 ⁻¹		
r6	DISC:p43/p41 → casp8 + DISC (МК)	10 ⁰ /10 ⁻¹		
Активация каспазы-8 под действием каспазы-3				
r7	pro6 –casp3 → casp6 (М-М)	10 ⁰ /10 ⁻¹	r3*	pro8 –casp3 → casp8 ($k_{38} \cdot C_{casp3}$)
r8	pro8 –casp6 → casp8 (М-М)	10 ⁻¹ /10 ⁰		
Ингибирование комплекса DISC				
r9	DISC + cFLIPL → DISC:cFLIPL (МК)	10 ¹ /10 ⁰	r4*	cFLIP + 2·DISC + pro8 → blocked complex ($k_{DISC_FLIP} \cdot C_{FLIP} \cdot C_{DISC}$)
r10	pro8 + DISC:cFLIPL → DISC:cFLIPL:pro8 (МК)	10 ⁰		
r11	DISC + cFLIPS → blocked DISC (МК)	10 ¹ /10 ⁰		
r12	DISC:pro8 + cFLIPL → DISC:cFLIPL:pro8 (МК)	10 ⁻² /10 ⁻³		
r13	DISC:pro8 + cFLIPS → blocked DISC (МК)	10 ⁻² /10 ⁻³		
r14	DISC:cFLIPL:pro8 → p43/p41 + blocked DISC (МК)	10 ⁻¹		
Активация каспазы-9 под действием цитохрома C				
r15	Cyt C stored → Cyt C ($f_{release}(t) \cdot C_{Cyt\ C\ stored}(0)$)	10 ²	r5*	pro9 → cleavage (формула (10))
r16	Apaf-1 + Cyt C → Cyt C:Apaf-1 (МК)	10 ²		
r17	Cyt C:Apaf-1 → Apaf-1 + Cyt C (МК)	10 ¹		
r18	pro9 + Cyt C:Apaf-1 → Apop (МК)	10 ⁰		
r19	Apop –casp3 → casp9 + Cyt C:Apaf-1 (М-М)	10 ⁰		
r20	Apop → casp9 + Cyt C:Apaf-1 (МК)	10 ⁻²		
Активация Bid				
r21	pro2 –casp3 → casp2 (М-М)	10 ⁰	r6*	Bid –casp8 → tBid ($k_{8Bid}/K_{m8Bid} \cdot C_{casp8} \cdot C_{Bid}$)
r22	Bid –casp8 → tBid (М-М)	10 ⁰		
r23	Bid –casp2 → tBid (М-М)	10 ⁻¹ /10 ⁰	r7*	pro2 –casp3 → cleavage ($k_{32} \cdot C_{casp3} \cdot C_{pro2}/(C_{pro2} + K_{m32})$)
Блокирование IAP посредством Smac				
r24	Smac stored → Smac ($f_{release}(t) \cdot C_{Smac\ stored}(0)$)	10 ²		–
r25	Smac + IAP → IAP:Smac (МК)	10 ⁻⁵		
r26	IAP:Smac → Smac + IAP (МК)	10 ⁻⁵		
Активация каспаз-3 и -7				
r27	pro3 –casp8 → casp3 (М-М)	10 ¹ /10 ⁰	r8*	pro3 –casp8 → casp3 (М-М)
r28	pro3 –casp9 → casp3 (М-М)	10 ⁻³ /10 ⁰		
r29	pro7 –casp8 → casp7 (М-М)	10 ⁰ /10 ⁻¹	r9*	pro7 –casp8 → cleavage ($k_{78}/K_{m78} \cdot C_{casp8} \cdot C_{pro7}$)
r30	pro7 –casp9 → casp7 (М-М)	10 ⁻⁵ /10 ⁻³		
Инактивация PARP				
r31	PARP –casp3 → cPARP (М-М)	10 ⁻¹	r10*	PARP –casp3 → cPARP ($k_{3PARP}/K_{m3PARP} \cdot C_{casp3} \cdot C_{PARP}$)
r32	PARP –casp7 → cPARP (М-М)	10 ⁰ /10 ⁻¹		
Ингибирование каспаз-3, -7 и -9				
r33	casp3 + IAP → casp3:IAP (МК)	10 ⁰	r11*	casp3 + IAP → inhibition (МК)
r34	casp7 + IAP → casp7:IAP (МК)	10 ⁻¹		
r35	casp9 + IAP → casp9:IAP (МК)	10 ⁻³		
r36	casp3:IAP → casp3 + IAP (МК)	10 ⁻²		
r37	casp7:IAP → casp7 + IAP (МК)	10 ⁻⁴ /10 ⁻³		
r38	casp9:IAP → casp9 + IAP (МК)	10 ⁻⁵ /10 ⁻⁴		

¹МК – массовая кинетика, М-М – кинетика Михаэлиса–Ментен

²Порядок скорости при высокой/низкой концентрации лиганда CD95L

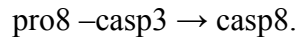
Далее, решая дифференциальное уравнение

$$\frac{dC_{CD95R}}{dt} = -k_{LR} \cdot C_{CD95R} \cdot C_{CD95L},$$

мы находим функцию изменения концентрации рецептора

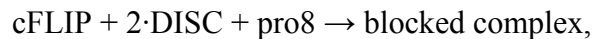
$$C_{CD95R} = \frac{R_0 - L_0}{1 - L_0 / R_0 \cdot \exp(-k_{LR} \cdot (R_0 - L_0) \cdot t)}. \quad (8)$$

Реакции активации каспазы-6 под действием каспазы-3 (r7) с последующей активацией каспазы-8 (r8) следуют кинетике Михаэлиса–Ментен с константами k_{36} , Km_{36} и k_{68} , Km_{68} соответственно. Заметим, что для обоих сценариев активации уровень концентрации каспазы-6 может быть аппроксимирован линейной функцией $b \cdot C_{casp3}$, где $b = 0.145$. Таким образом, эти реакции можно объединить в одну реакцию (r3*) с константами $k_{38} = 0.145 \cdot k_{68}$ и $Km_{38} = Km_{68}$.



Анализируя функцию скорости этой реакции $k_{38} \cdot C_{pro8} \cdot C_{casp3} / (Km_{38} + C_{pro8})$ для низкой концентрации лиганда, находим, что $C_{pro8} \gg Km_{38}$, в то время как для высокой концентрации скорость реакции r3* много меньше, чем скорость активации, опосредованной CD95. Поэтому без существенных изменений в результатах симуляции мы можем установить в r3* линейный кинетический закон $v_{r3*} = k_{38} \cdot C_{casp3}$.

Рассмотрим цепочку ингибирования комплекса DISC посредством cFLIP. Последние три реакции в этой цепочке (r12-r14) имеют малый порядок скорости, поэтому мы ими пренебрегаем. Далее, удаляя короткоживущий комплекс DISC:cFLIPL, мы находим, что белки cFLIPL и cFLIPS, а также комплексы DISC:cFLIPL:pro8 и blocked DISC (инактивированный DISC) имеют одни и те же кинетические законы формирования и распада. Применяя метод объединения, мы сокращаем данную цепочку до одной реакции (r4*):

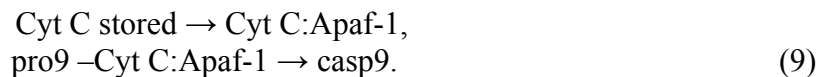


где cFLIP соответствует двум изоформам cFLIPL и cFLIPS, а blocked complex обозначает DISC:cFLIPL:pro8 и blocked DISC.

2. Модуль активации каспазы-9

Данный модуль содержит 18 белков и 14 реакций, включающих активацию каспазы-9 под действием цитохрома C, расщепление/активацию Bid каспазами-2 и -8, ингибирование активности каспазы-9 посредством IAP и связывание этого ингибитора белком Smac (r15-r26, r35, r38). Последние две реакции обратимы и протекают гораздо медленнее, чем остальные реакции модуля, поэтому ими можно пренебречь.

Рассматривая цепочку активации каспазы-9 под действием цитохрома C (r15-r20), мы удаляем медленную реакцию непосредственного распада апоптосомного комплекса (r20). Далее, учитывая тот факт, что этот комплекс является короткоживущим, а скорости реакций r15 и r16 линейно зависимы, приводим данную цепочку к виду:



Согласно данным М. Ventele и соавт., мы имеем следующий закон высвобождения цитохрома C из митохондрий:

$$\begin{aligned} C_{\text{Cyt C stored}} &= C_{\text{Cyt C stored}}(0) \cdot f_{\text{release}}(t), \\ \frac{dC_{\text{Cyt C released}}}{dt} &= -\frac{dC_{\text{Cyt C stored}}}{dt}, \end{aligned}$$

где $f_{release}(t)$ задается формулой (3). Отсюда с учетом (9), игнорируя деградацию комплекса Cyt C:Araf-1, мы находим

$$\frac{dC_{Cyt\ C:Araf-1}}{dt} = -c \cdot \frac{dC_{Cyt\ C\ stored}}{dt},$$

где $c = 0.59$ – коэффициент линейности.

Заметим, что в исходной модели экспериментальные измерения, фиксирующие уровень концентрации прокаспазы-9, приводятся только для начальной концентрации anti-CD95, равной 200 нг/мл. В этом случае деградация прокаспазы-9 не оказывает значительного влияния на ее уровень. Поэтому, пренебрегая деградацией и учитывая, что скорость второй реакции в (9) задается функцией $k_{Apop} \cdot C_{pro9} \cdot C_{Cyt\ C:Araf-1}$, мы получаем уравнение скорости изменения концентрации прокаспазы-9:

$$\frac{dC_{pro9}}{dt} = -0.59 \cdot (1 - f_{release}(t) \cdot C_{Cyt\ C\ stored}(0) \cdot k_{Apop} \cdot C_{pro9}).$$

Решая это уравнение, мы находим

$$C_{pro9} = C_{pro9}(0) \cdot \left(\frac{f_{release}(t) \cdot (\exp(k_{contr} \cdot t) - 1) + 1}{\exp(k_{contr} \cdot t)} \right)^{\frac{0.59 \cdot C_{Cyt\ C\ stored}(0) \cdot k_{Apop}}{k_{contr}}}. \quad (10)$$

Анализируя реакции активации Bid (r21-r23), удаляем более медленную реакцию, опосредуемую каспазой-2. Аналогичная реакция, в которой участвует каспаза-8, следует кинетике Михаэлиса–Ментен с константой $Km_{28Bid} \gg C_{Bid}$. Таким образом, кинетику данной реакции можно записать на основе закона действующих масс: $v_{r6*} = k_{8Bid}/Km_{8Bid} \cdot C_{casp8} \cdot C_{Bid}$.

3. Модуль инактивации PARP

Данный модуль содержит 11 белков и 10 реакций, шесть из которых (активация каспаз-3, -7 каспазами-8, -9 и расщепление/инактивация PARP) описываются кинетикой Михаэлиса–Ментен (r27-r32), а четыре воспроизводят обратимое ингибирование каспаз-3 и -7 на основе закона действующих масс (r33, r34, r36, r37).

Заметим, что распад комплексов casp3:IAP и casp7:IAP относится к медленным реакциям модуля. Поэтому, как и ранее, мы пренебрегаем этими реакциями. Далее, анализируя расщепление прокаспаз-3 и -7, мы удаляем реакции под действием каспазы-9, которые являются более медленными по сравнению с аналогичными реакциями, вызываемыми каспазой-8. По этой же причине мы игнорируем реакцию инактивации PARP каспазой-3.

Рассматривая оставшиеся реакции с кинетикой Михаэлиса–Ментен (r29, r32), мы устанавливаем для них неравенства $Km_{78} \gg C_{pro7}$ и $Km_{7PARP} \gg C_{PARP}$, из которых с учетом (7) следует, что кинетические законы этих реакций можно привести соответственно к виду

$$v_{r9*} = k_{78}/Km_{78} \cdot C_{casp8} \cdot C_{pro7} \quad \text{и} \quad v_{r10*} = k_{3PARP}/Km_{3PARP} \cdot C_{casp3} \cdot C_{PARP},$$

где $k_{3PARP} = 0.18 \cdot k_{7PARP}$ и $Km_{3PARP} = Km_{7PARP}$.

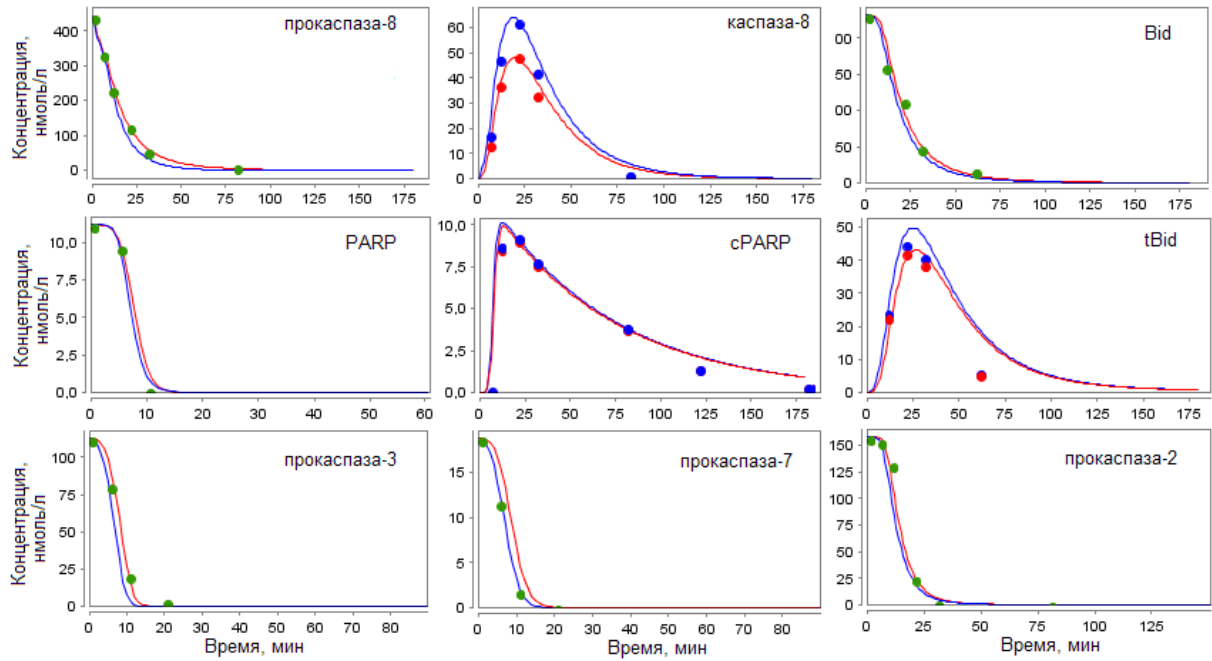
Наконец, игнорируя деградацию прокаспазы-7, IAP и PARP, мы заканчиваем редукцию данного модуля.

АНАЛИЗ МИНИМАЛЬНОЙ АППРОКСИМАЦИИ МОДЕЛИ АПОПТОЗА

Исследование модели сигнального пути рецептора CD95, которая содержит 42 белка, 78 реакций и 45 кинетических параметров, показало, что она может быть заменена ее аппроксимацией (рис. 1B), содержащей 15 белков, 20 реакций и 24

параметра. На рисунке 2 приведено сравнение результатов симуляции исходной и редуцированной моделей с экспериментальными данными. Заметим, что концентрации белков были измерены при помощи метода Вестерн-блот и представляют собой относительные значения изменения концентраций. Для белков, имеющих ненулевую начальную концентрацию, такие значения могут быть однозначно переведены в точные величины. Однако для таких белков, как каспаза-8, tBid или PARP, точные значения напрямую зависят от концентрации в конце (или в середине) временного интервала симуляции модели, а ее величина в ходе редукации модели может меняться. Поэтому при вычислении функции расстояний (4) экспериментальные значения указанных трех белков были пересчитаны.

CD95L = 5 мкг/мл



CD95L = 200 нг/мл

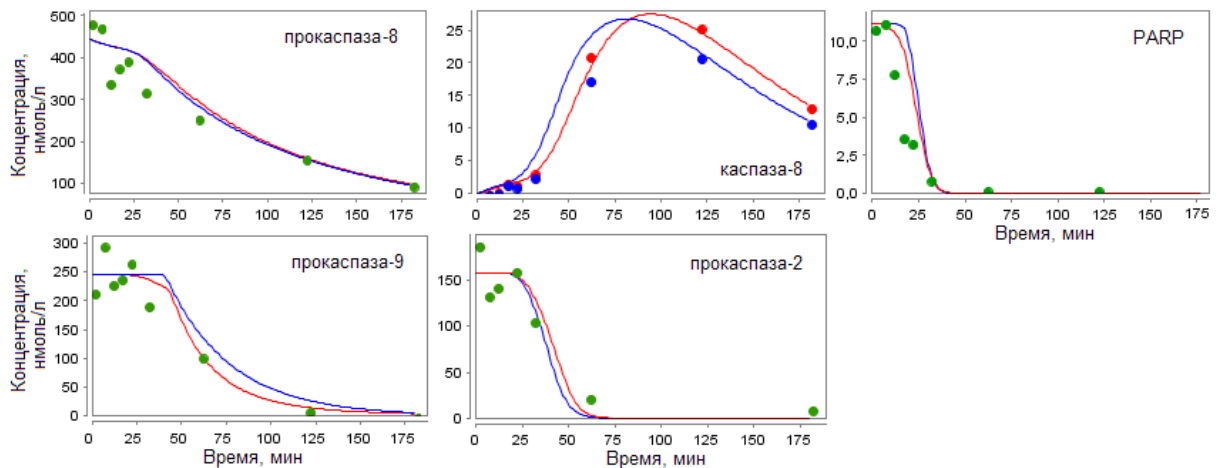


Рис. 2. Сравнение результатов симуляции исходной и редуцированной моделей апоптоза с экспериментальными данными. Кривые – результат симуляции; точки – экспериментальные данные. Красный цвет соответствует данным, полученным для исходной модели, синий – для редуцированной, зеленый цвет – общие для обеих моделей данные.

Проведем более подробное исследование свойств редуцированной модели апоптоза.

Минимальность модели. Экспериментальные данные определяют динамику 10 из 15 белков полученной модели. Остальные белки (CD95L, DISC, cFLIP, IAP и каспаза-3), а также реакции $r1^* - r11^*$ существенным образом влияют на ее поведение (табл. 2).

Таким образом, дальнейшая редукция модели посредством удаления этих сущностей невозможна.

Рассмотрим процесс деградации. Как отмечают авторы исходной модели, экспериментальная динамика не может быть воспроизведена, если этот процесс игнорируется. Действительно, в этом случае для всех экспериментально промеренных белков (за исключением прокаспаз-7, -9 и PARP, скорость расщепления которых при соответствующих концентрациях лиганда заметно превышает скорость деградации) не будет наблюдаться снижение концентрации до уровня, устанавливаемого экспериментальными данными. Процесс является критичным также для каспазы-3 и DISC, динамика которых задает скорость активации каспазы-8. Деградация остальных белков в ходе редукции была опущена. Таким образом, число элементов (реакций и белков) полученной модели не может быть сокращено. Следовательно, она является минимальной.

Качество согласия с экспериментальными данными. Вычисление значения функции расстояний (4) для исходной и редуцированной моделей (табл. 3) показало, что в случае быстрого сценария активации каспаз аппроксимация экспериментальных данных улучшилась на 25.9% по сравнению с исходной моделью, а в случае медленного сценария активации ухудшилась на 12.2%. То есть в среднем качество аппроксимации улучшилось на 6.85%.

Таблица 2. Роль белков CD95L, DISC, cFLIP, IAP и каспазы-3, а также реакций $r1^*$ – $r11^*$ в процессе апоптоза, описываемого редуцированной моделью

Белки	Реакции	Роль в процессе апоптоза
CD95L	$r1^*$	Запуск процесса апоптоза.
DISC	$r2^*$	Активация каспазы-8 внутри комплекса DISC. В случае высокой концентрации лиганда DISC не является короткоживущим комплексом, поэтому реакции $r1^*$ и $r2^*$ не могут быть объединены.
Каспаза-3	$r3^*$	Активация каспазы-8 по механизму обратной связи. Этой связью нельзя пренебречь, т.к. при низкой концентрации CD95L скорость реакции $r3^*$ на порядок выше скорости $r2^*$. В этом случае активация каспазы-8 происходит в основном за счет каспазы-3.
	$r7^*$	Расщепление прокаспазы-2, скорость которого определяется экспериментальными данными.
	$r8^*$	Активация каспазы-3, которая играет существенную роль при расщеплении прокаспаз-2, -8 и PARP.
	$r10^*$	Инактивация PARP, фиксируемая экспериментальными замерами концентраций PARP и cPARP.
cFLIP	$r4^*$	Ингибирование комплекса DISC. cFLIP блокирует активность DISC, предотвращая существенный рост каспазы-8. Это наблюдение согласуется с заключением M. Bentele и соавт., которые утверждают, что снижение регуляции cFLIP приводит к гибели клеток уже при низкой концентрации anti-CD95 (1 нг/мл).
	$r5^*$, $r6^*$, $r9^*$	Активация Bid и расщепление прокаспаз-7 и -9. Данные реакции устанавливают динамику указанных белков в соответствие с экспериментальными данными.
IAP	$r11^*$	Ингибирование каспазы-3. В случае медленного сценария активации каспаз IAP предотвращает избыточную активность каспазы-3 и, соответственно, избыточный рост каспазы-8, обусловленный реакцией $r3^*$.

Сравнение моделей с помощью информационного критерия Акаике (AIC). Данный критерий находит сложность модели на основе качества согласия с экспериментальными данными с учетом числа параметров модели n_p :

$$AIC = \chi^2 + 2 \cdot n_p,$$

функция χ^2 определяется по формуле (4) с весами $\omega_i = 1/\sigma_{ij}^2$ [6], а среднее отклонение σ_{ij} экспериментальной точки $C_{\text{exp}}(i, j)$ задается с помощью сглаживающего сплайна [7]

$$\sigma_{ij}^2 = \frac{1}{4} \sum_{k=-2}^2 (C_{\text{pred}}(i, j+k) - C_{\text{exp}}(i, j-k))^2.$$

Расчет коэффициентов AIC (табл. 3) показывает, что редуцированная модель апоптоза для обеих начальных концентраций лиганда имеет меньшую сложность по сравнению с исходной моделью и, следовательно, является более предпочтительной с точки зрения этого критерия.

Таблица 3. Анализ качества согласия исходной и редуцированной моделей апоптоза с экспериментальными данными, а также их сравнение с помощью информационного критерия Акаике (AIC)

Начальная концентрация anti-CD95	Значение функции расстояний		AIC	
	Исходная модель	Редуцированная модель	Исходная модель	Редуцированная модель
5 мкг/мл	335.62	248.71	139.16	96.38
200 нг/мл	775.90	870.56	124.61	81.73

Анализ устойчивого состояния модели. В ходе данного анализа (табл. 4) было установлено, что устойчивые состояния экспериментально промеренных белков для разных концентраций лиганда в результате редукции практически не изменились.

Таблица 4. Анализ устойчивых состояний экспериментально промеренных белков для исходной и редуцированной моделей апоптоза (точность 10^{-8})

Белки	anti-CD95 = 5 мкг/мл		anti-CD95 = 200 нг/мл	
	Исходная модель	Редуцированная модель	Исходная модель	Редуцированная модель
Прокаспаза-2	0.00134398	0.00136022	0.00003742	0.00003157
Прокаспаза -3	0.0	0.0	–	–
Прокаспаза -7	0.0	0.0	–	–
Прокаспаза -8	0.00000160	0.0	25.17004553	27.22403915
Прокаспаза -9	–	–	0.0	0.0
Каспаза-8	0.0	0.0	0.0	0.0
Bid	0.04118402	0.03429905	–	–
tBid	0.09016015	0.10409352	–	–
PARP	0.0	0.00000137	0.0	0.0
cPARP	0.0	0.0	–	–

Анализ на чувствительность параметров выявляет, насколько устойчивое состояние модели зависит от возмущения параметров. С этой целью вычисляются частные производные устойчивых концентраций C_i^{ss} , $i = 1, \dots, m$, по всем параметрам p_j , $j = 1, \dots, n_p$,

$$S_{ij} = \frac{\partial C_i^{ss}}{\partial p_j} = \frac{C_i^{ss}(p_j + \Delta p_j) - C_i^{ss}(p_j)}{\Delta p_j}.$$

В ходе анализа была найдена средняя чувствительность всех перечисленных в таблице 4 белков, определяемая по формуле

$$S^{mean} = \frac{\sum_{i,j} \ln S_{ij}}{n_p \cdot s}, \quad i = 1, \dots, s, \quad j = 1, \dots, n_p,$$

где s – число белков, экспериментальная динамика которых известна для исследуемой концентрации лиганда. Для исходной модели значения S^{mean} были найдены при $n_p = 45$

(все параметры модели) и $n_p = 24$ (параметры, сохранившиеся в ходе редукции). Результаты анализа и выводы, которые следуют из них, приведены в таблице 5.

Таблица 5. Анализ устойчивых состояний экспериментально промеренных белков на чувствительность параметров¹

Концентрация anti-CD95	Средняя чувствительность		Вывод
	Исходная модель	Редуцированная модель	
5 мкг/мл	-28.88 (-27.73)	-27.72	Средняя чувствительность белков к параметрам, сохранившимся в ходе редукции, не изменилась. Общая чувствительность модели возросла из-за удаления несущественных параметров.
200 нг/мл	-24.06 (-23.49)	-43.77	Устойчивое состояние редуцированной модели стало более стабильным по сравнению с устойчивым состоянием исходной модели.

Таким образом, по сравнению с исходной моделью редуцированная модель:

- дает четкое понимание процесса, что облегчает исследование и интерпретацию ее свойств;
- лучше аппроксимирует экспериментальные данные;
- согласно критерию Акаике имеет заметно меньшую сложность;
- имеет более стабильное устойчивое состояние при возмущении параметров.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе рассмотрена модель регуляции апоптоза, опосредуемой рецептором CD95. На основе методов редукции, реализованных в программном комплексе BioUML, найдена минимальная модель, которая аппроксимирует динамику экспериментальных данных, полученных для исходной модели. Примененный подход позволяет оптимизировать объемные модели с большим числом биохимических реакций и упрощать вычисления, что является важным моментом при создании на их основе более сложных комплексных моделей биологических систем.

Дополнительная ценность работы заключается в том, что она показывает процесс редукции моделей по шагам и может быть использована в качестве обучающего материала.

Автор выражает благодарность Федору Анатольевичу Колпакову и Андрею Юрьевичу Зиновьеву за постановку задачи и внимание на всех этапах работы, а также Руслану Нильевичу Шарипову за ценные замечания при подготовке статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MacFarlane M., Williams A.C. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep.* 2004. V. 5. P. 674–678.
2. Krammer P.H., Rüdiger A., Lavrik I.N. Life and death in peripheral T cells. *Nature Reviews Immunology.* 2007. V. 7. P. 532–542.
3. Bentele M., Lavrik I., Ulrich M., Stöber S., Heermann D.W., Kalthoff H., Krammer P.H., Eils R. Mathematical modeling reveals threshold mechanism in CD95-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2004. V. 166. Is. 6. P. 839–851.

¹ Для исходной модели была посчитана средняя чувствительность на возмущение всех параметров и параметров, сохранившихся в ходе редукции (значение в скобках).

4. Gorban A.N., Radulescu O., Zinovyev A.Y. Asymptotology of Chemical Reaction Networks. *Chem Eng Sci.* 2009. V. 65. P. 2310–2324.
5. Choi J, Yang K.W., Lee T.Y., Lee S.Y. New time-scale criteria for model simplification of bio-reaction systems. *BMC Bioinformatics.* 2008. V. 9. Article number 338.
6. Quaiser T., Dittrich A., Schaper F., Mönnigmann M. A simple workflow for biologically inspired model reduction – application to early JAK-STAT signaling. *BMC Systems Biology.* 2011. V. 5. Article number 30.
7. Schilling M., Maiwald T., Hengl S., Winter D., Kreutz C., Kolch W., Lehmann W. D., Timmer J., Klingmüller U. Theoretical and experimental analysis links isoform-specific ERK signaling to cell fate decisions. *Molecular Systems Biology.* 2009. V. 5. Article number 334.

Материал поступил в редакцию 19.01.2012, опубликован 03.02.2012.