

УДК: 51-76

## Применение методов редукции для построения комплексной модели апоптотических путей

©2012 Кутумова Е.О.<sup>\*,1,2</sup>, Зиновьев А.Ю.<sup>3,4</sup>, Шарипов Р.Н.<sup>2,5</sup>,  
Колпаков Ф.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Конструкторско-технологический институт вычислительной техники СО РАН,  
Новосибирск 630090, Россия

<sup>2</sup>ООО “Институт системной биологии”, Новосибирск 630090, Россия

<sup>3</sup>Institut Curie, Paris F-75248, France

<sup>4</sup>Институт вычислительного моделирования СО РАН, Красноярск 660036, Россия

<sup>5</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск 630090, Россия

**Аннотация.** В работе предлагается новый подход для объединения математических моделей биологических систем на основе их редукции. Данный подход описан на примере двух моделей апоптоза, рассматривающих про- и антиапоптотические (активация NF-κB) пути рецептора CD95.

**Ключевые слова:** математическое моделирование, редукция модели, CD95-индуцируемый апоптоз, транскрипционный фактор NF-κB, BioUML.

### ВВЕДЕНИЕ

При моделировании биологических систем каждая из них порождает множество моделей, различных по назначению, степени адекватности и технологии конструирования. Детальное изучение системы требует развития методики объединения индивидуальных моделей, затрудняемое тем, что эти модели, как правило, имеют разный уровень абстракции, т.е. могут описывать одни и те же сигнальные пути, используя разные цепочки реакций, химическую кинетику или множества параметров, имеющих разный порядок.

Примером биологической системы является клетка, внутри которой происходят сложнейшие процессы, включая процесс генетически запрограммированной клеточной гибели (апоптоз), который играет важную роль в поддержании клеточного гомеостаза и способствует удалению поврежденных и избыточных клеток в организме [1]. Изучение механизмов апоптоза привело к созданию ряда математических моделей, описывающих различные сигнальные пути процесса. При этом размерность большинства из них (число элементов и параметров) существенно больше объема экспериментальных данных, используемых для их верификации. Таким образом, в настоящее время актуальны две основные проблемы, целью которых является построение комплексной модели апоптоза. С одной стороны, необходимо производить редукцию существующих моделей для выявления ключевых элементов (белков, генов, реакций и т.д.), влияющих на динамику процесса, а с другой стороны, требуется разработка методов, позволяющих выполнять объединение этих моделей.

С этой целью в данной работе рассмотрены две модели апоптоза, индуцируемого рецептором CD95. Первая из них (модель Bentele [2]), исследует проапоптотические свойства рецептора в ходе его стимуляции агонистическими антителами (anti-CD95).

\*elena.kutumova@biouml.org

Редукция этой модели была ранее описана в работе [3]. Вторая модель (модель Neumann [4]) характеризует дилемму между гибелью клетки и ее выживанием, возможным за счет активации транскрипционного фактора NF-κB под действием CD95. В ходе создания этой модели авторы произвели ее упрощение на основе аналитических рассуждений. Например, были опущены детали образования ряда комплексов, удалены некоторые вещества, для которых отсутствовали экспериментальные данные, и т.д. После каждой итерации упрощения выполнялась процедура верификации параметров. Упрощение производилось до тех пор, пока качество согласия моделируемых концентраций с экспериментальными данными снижалось незначительно. Авторы сделали вывод о том, что дальнейшее упрощение модели невозможно, т.к. ведет к резкому ухудшению аппроксимации экспериментальных данных. Однако, проведя математический анализ этой модели, мы смогли дополнительно удалить ряд элементов без существенных изменений в результатах численного моделирования.

Подробное исследование исходных математических моделей CD95-индуцируемого апоптоза и их редукция позволили нам найти последовательность шагов для их объединения. Анализ, редукция и объединение моделей проводились с использованием программного комплекса BioUML (<http://www.biouml.org>).

### МЕТОДЫ АНАЛИЗА И РЕДУКЦИИ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Математическое моделирование биологических процессов предполагает, что модель состоит из множества веществ  $S = (S_1, \dots, S_m)$ , концентрации которых зависят от времени  $t \in [0, T]$ ,  $T \in R^+$ , и задаются вектором  $C(t) = (C_1(t), \dots, C_m(t))$ , а также набора биохимических реакций со скоростями  $v(t) = (v_1(t), \dots, v_n(t))$ , которые вычисляются согласно одному из стандартных кинетических законов [5]. Для описания поведения биологической системы во времени используется задача Коши:

$$\frac{dC(t)}{dt} = N \cdot v(C, K, t), \quad C(0) = C^0 \in (R^+)^m, \quad (1)$$

где  $N$  – стехиометрическая матрица  $m \times n$ , а  $K$  – множество кинетических параметров. При этом вектор  $C^{ss} \in (R^+)^m$  является стационарным состоянием системы (1), если

$$N \cdot v(C^{ss}, K, t) = 0, \quad \lim_{t \rightarrow \infty} C_i(t) = C_i^{ss}. \quad (2)$$

Идентификация параметров  $K$  и начальных концентраций  $C^0$  осуществляется на основе экспериментальных данных, которые соответствуют набору точек, фиксирующих значения переменных  $C_1(t), \dots, C_l(t)$ ,  $l \leq m$ , вектора  $C(t)$  в заданные моменты времени  $t_{ij}$ ,  $j = 1, \dots, r_i$ ,  $i = 1, \dots, l$ . Задача идентификации сводится к нахождению минимума целевой функции расстояний [6]:

$$f_{dist}(C^0, K) = \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^{r_i} \frac{\omega_{\min}}{\omega_i} \cdot (C_i(t_{ij}) - C_i^{\exp}(t_{ij}))^2, \quad (3)$$

где  $C_i^{\exp}(t_{ij})$  и  $C_i(t_{ij})$  – экспериментальные и полученные в ходе численного моделирования значения переменных в момент времени  $t_{ij}$ , а веса  $\omega_i = (r_i^{-1} \sum_j (C_i^{\exp}(t_{ij}))^2)^{1/2}$  учитываются для того, чтобы все переменные имели одинаковую значимость. При этом  $\omega_{\min} = \min_i \omega_i$ .

Важным аспектом при анализе математической модели является нахождение ключевых параметров, которые влияют на изменение экспериментальной динамики переменных. В связи с этим на основе информационного критерия Акаике [7] вычисляется относительная сложность модели

$$AIC = \chi^2 + 2 \cdot |K|, \quad (4)$$

где  $|K|$  соответствует мощности множества параметров. Функция  $\chi^2$  определяется по формуле (3) с весами  $1/\sigma_{ij}^2$  (вместо  $\omega_{\min}/\omega_i$ ), а значения  $\sigma_{ij}$  вычисляются по следующему правилу [8]:

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

Если для некоторого индекса  $i = 1, \dots, l$  выполняется  $j + k < 0$  или  $j + k > r_i$ , полагаем  $C_i(t_{i,j+k}) = C_i^{\text{exp}}(t_{i,j+k}) = 0$ .

Вычисление коэффициентов  $AIC$  (4) может оказаться полезным не только для сравнения моделей, аппроксимирующих один и тот же набор экспериментальных данных, но и для сопоставления моделей, верификация которых была основана на разных наборах данных. Для этого определяются усредненные значения

$$AIC_{\text{mean}} = \frac{AIC}{n_{\text{exp}}}, \quad (5)$$

где  $n_{\text{exp}}$  обозначает число экспериментальных точек в наборе соответствующих данных.

Уменьшить относительную сложность моделей позволяют методы редукции [9], направленные на преобразование системы (1) в систему более низкого порядка без существенного изменения динамики переменных  $C_1(t), \dots, C_l(t)$ . Список методов, непосредственно используемых в данном исследовании для редукции моделей регуляции апоптоза, перечислен в работе [3].

*Минимальной аппроксимацией модели* будем называть модель с минимальным числом элементов (белков и реакций), для которой значение функции (3) превышает исходное значение не более чем на 20%. Указанный порог обусловлен тем, что в текущей работе рассматриваются экспериментальные данные, полученные с помощью технологии Вестерн-блот с учетом стандартного отклонения 15–20% [2,4].

При исследовании системы (1) полезным может оказаться анализ стационарных значений  $C_i^{ss}$ ,  $i = 1, \dots, l$ , переменных  $C_1(t), \dots, C_l(t)$ , определяемых согласно условиям (2), на чувствительность при возмущении параметров  $K$ . С этой целью находится матрица частных производных этих переменных по параметрам  $p_j \in K$ ,  $j = 1, \dots, |K|$ :

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

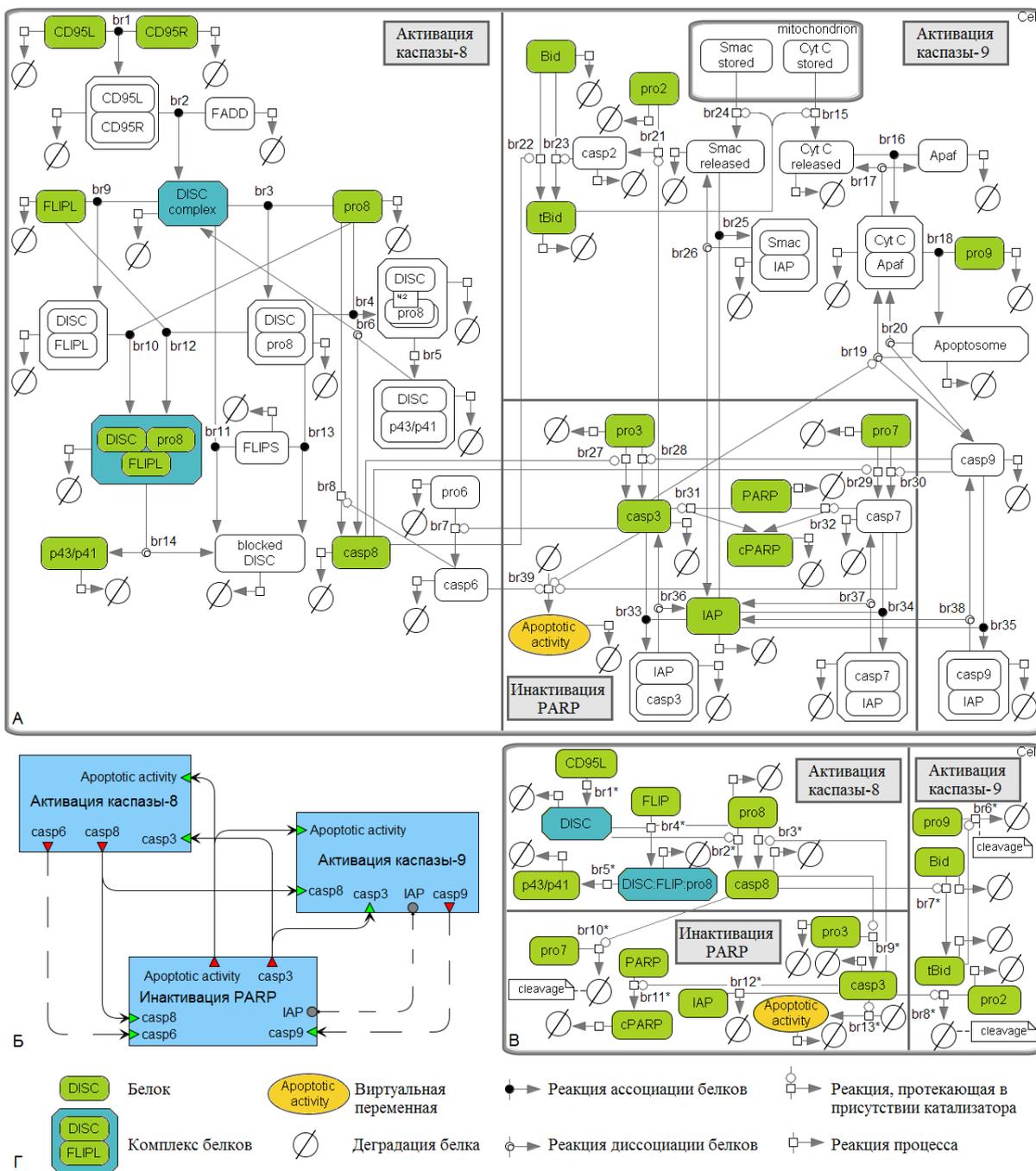
Также может быть найдена средняя чувствительность переменных  $C_i^{ss}$ , определяемая по формуле:

$$S^{\text{mean}} = \frac{\sum_{i,j} \ln|S_{ij}|}{n_p \cdot l}, \quad i = 1, \dots, l, \quad j = 1, \dots, n_p, \quad (6)$$

где  $n_p$  – число всех параметров модели, равное  $|K|$ , либо число параметров, сохранившихся в ходе редукции модели.

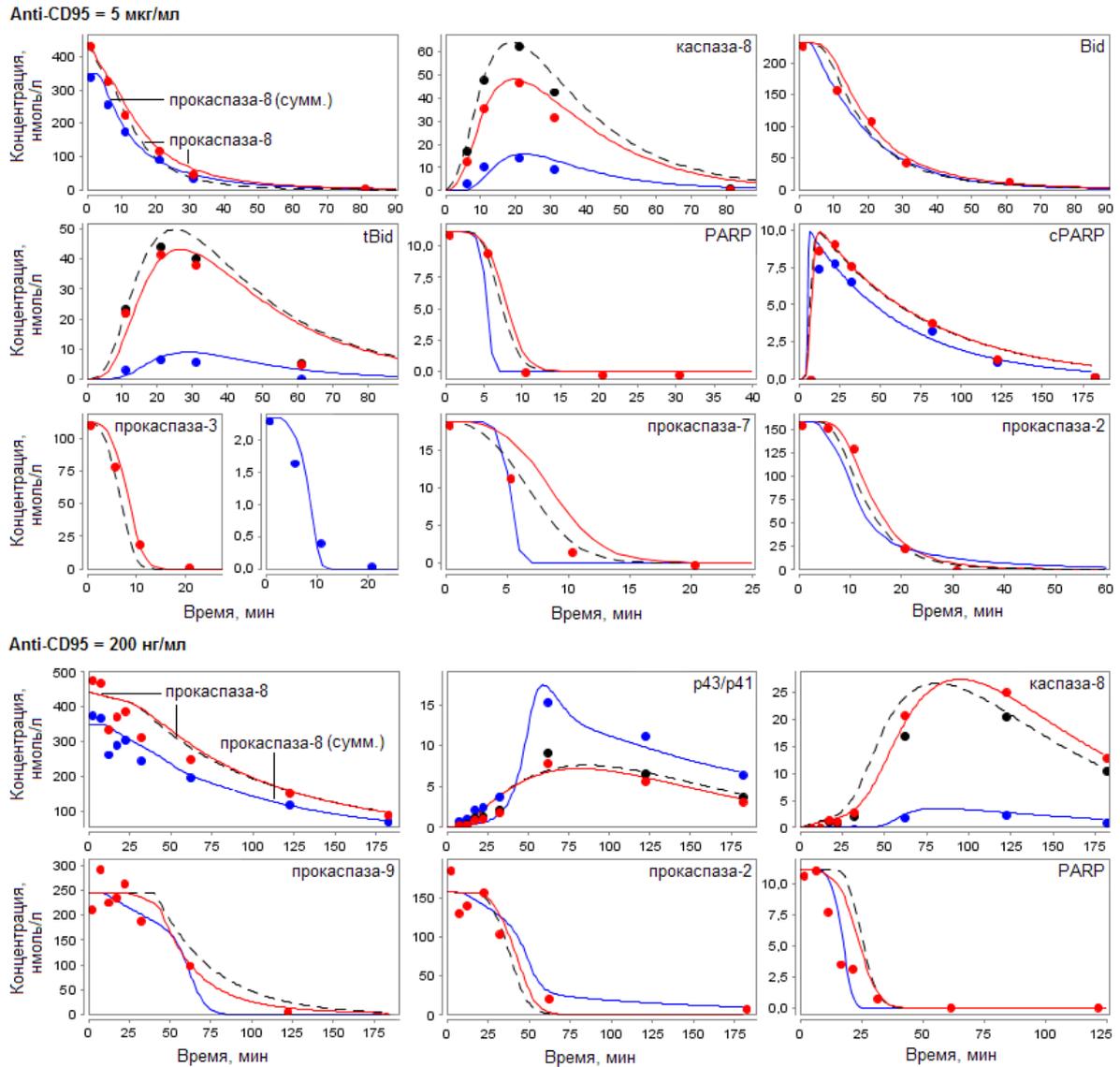
### РЕДУКЦИЯ МОДЕЛИ BENTELE

Редукция данной модели (рис. 1А) подробно изложена в работе [3]. В частности, модель была разделена на модули (рис. 1Б) в соответствии с тремя промежуточными этапами процесса – активацией каспаз-8, -9 и инактивацией PARP. В результате редукции исходная модель, состоящая из 42 переменных, 78 реакций и 45 кинетических параметров, была сведена к минимальной аппроксимации, включающей 15 переменных, 20 реакций и 24 параметра (рис. 1В).



**Рис 1.** Модель индукции 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. Белки, сохраненные в ходе редукции, выделены цветом. **Б.** Модульное представление модели. Пунктирные линии обозначают соединения, удаленные в ходе редукции. **В.** Минимальная модель, полученная в результате редукции. **Г.** Графическая нотация SBGN [10], используемая для представления моделей А и В.

Экспериментальные данные, полученные Bentele с соавторами для клеток SKW 6.4, фиксировали динамику 10 из 15 белков редуцированной модели (прокаспаз-2, -3, -7, -8, -9, каспазы-8, PARP, cPARP, Bid и tBid).



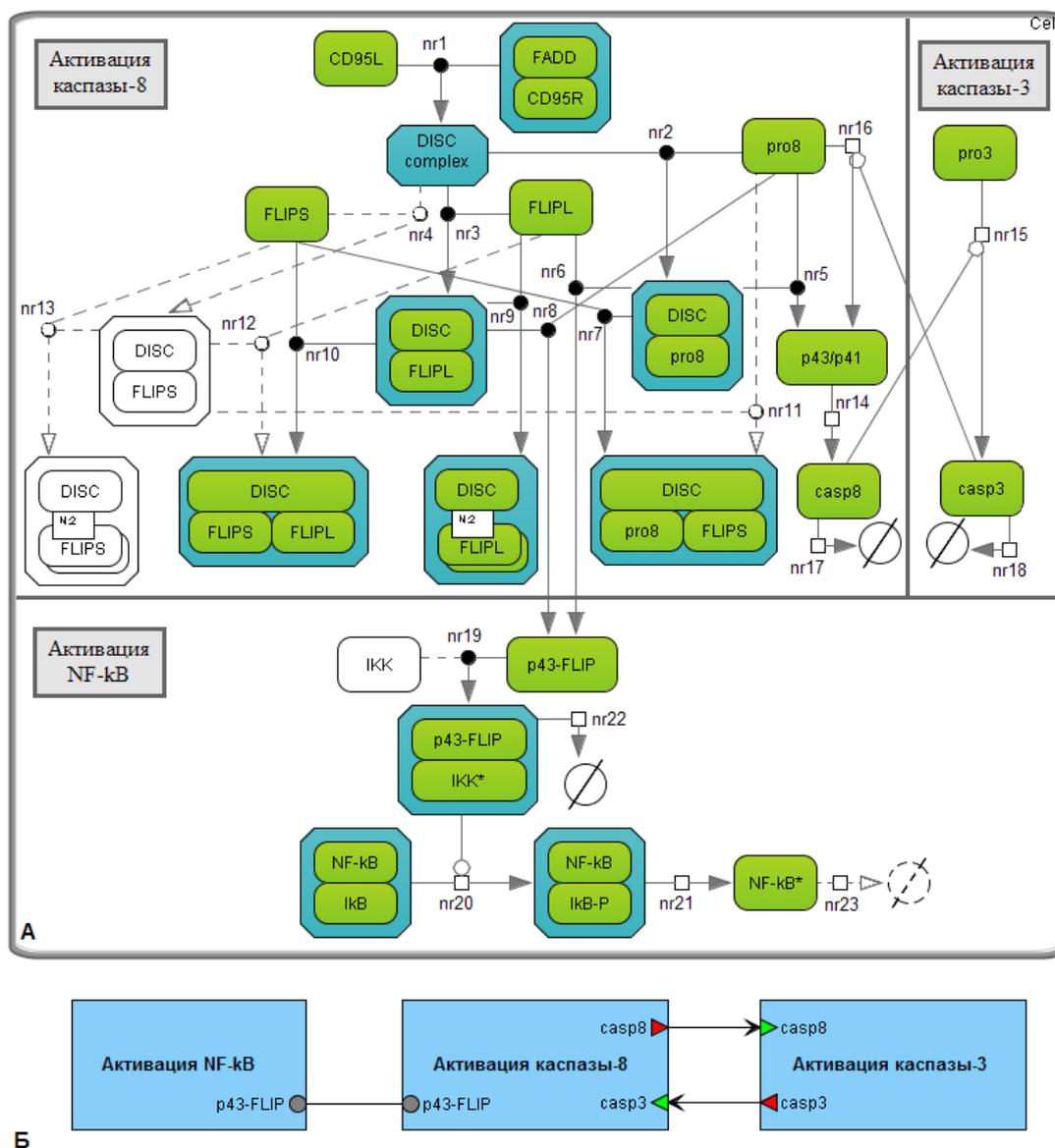
**Рис. 2.** Результаты аппроксимации экспериментальных данных М. Bentele и соавт. (точки) для исходной модели (красный), редуцированной модели (черный) и объединенной модели (синий). В случае совпадения экспериментальных значений синие и черные точки были опущены. Поскольку экспериментальные значения концентраций были получены при помощи технологии Вестерн-блот и выражены в условных единицах измерения, точные значения устанавливались относительно результатов численного моделирования концентраций. При рассмотрении концентрации прокаспазы-8 в исходной модели необходимая динамика наблюдалась только для отдельного белка, а не для суммарной концентрации, как ожидалось из экспериментов. Поэтому при идентификации параметров объединенной модели на основании данных М. Bentele и соавт. рассматривался общий уровень концентрации прокаспазы-8.

В данной работе дополнительно были рассмотрены данные для продукта расщепления прокаспазы-8 p43/p41 (рис. 2). В связи с этим редуцированная модель была расширена за счет элементов, участвующих в формировании этого продукта (белки DISC:FLIP:pro8, p43/p41, реакция br5\*, соответствующая реакции br14 в исходной модели, реакции деградации указанных белков). Также виртуальная переменная  $\chi_{apop\ activity}$ , с помощью которой Bentele с соавт. моделируют процесс

деградации, была добавлена нами в модель для наглядности в качестве виртуального белка (элемент “Apoptotic activity” на рис. 1А-В), продуцируемого посредством реакции b39 (br13\*) и имеющего свою скорость деградации  $k_{\text{degrad death}} \cdot x_{\text{apop activity}}$ . При этом дифференциальное уравнение, соответствующее данному элементу, осталось тем же, что и ранее [3].

Таким образом, редуцированная модель CD95-индуцируемого апоптоза, исследуемая в данной работе, состоит из 18 переменных, 25 реакций и 25 параметров.

### РЕДУКЦИЯ МОДЕЛИ NEUMANN



**Рис. 3.** Модель CD95-индуцируемого апоптоза, регулируемого NF-kB, и результаты ее редукции. **А.** Исходная модель, разделенная на 3 модуля. Белки, сохраненные в ходе редукции, выделены цветом, реакции – сплошными линиями. **Б.** Модульное представление модели. Активация каспазы-8 и p43-FLIP (продукт расщепления cFLIP) происходит в комплексе DISC и запускает параллельные процессы клеточной смерти и выживания.

Данная модель [4] содержит 23 белка, 23 реакции со скоростями, моделируемыми на основе закона действующих масс, а также 17 кинетических параметров (рис. 3А). Модель воспроизводит экспериментальную динамику концентраций восьми белков

(суммарного количества прокаспазы-8, продукта ее расщепления p43/p41, прокаспазы-3, каспаз-3, -8, а также белков IкВ- $\alpha$ , IкВ- $\alpha$ -P и p43-FLIP). Данная динамика была получена авторами с помощью технологии Вестерн-блот для клеток HeLa с учетом трех различных концентраций антител anti-CD95 (1500, 500 и 250 нг/мл).

В ходе редукции модели мы удалили очень медленные реакции nr4, nr11-nr13 (рис. 3А), а также реакцию деградации NF-кВ (nr23), которая не оказывала влияния на аппроксимацию экспериментальных данных. При этом медленные реакции nr6 и nr7 могли быть также исключены из рассмотрения. Однако в соответствии с предсказаниями модели реакция nr6 регулировала подавление апоптоза в случае высоких концентраций cFLIPL и прокаспазы-8 (см. раздел анализа предсказаний), а реакция nr7 оказалась необходимой при объединении исследуемых моделей, рассматриваемом ниже. Поэтому на этапе редукции данной модели мы сохранили эти реакции.

Далее, принимая во внимание неравенство  $C_{IKK} \gg C_{p43-FLIP}$ , мы упростили кинетический закон реакции nr19 вида

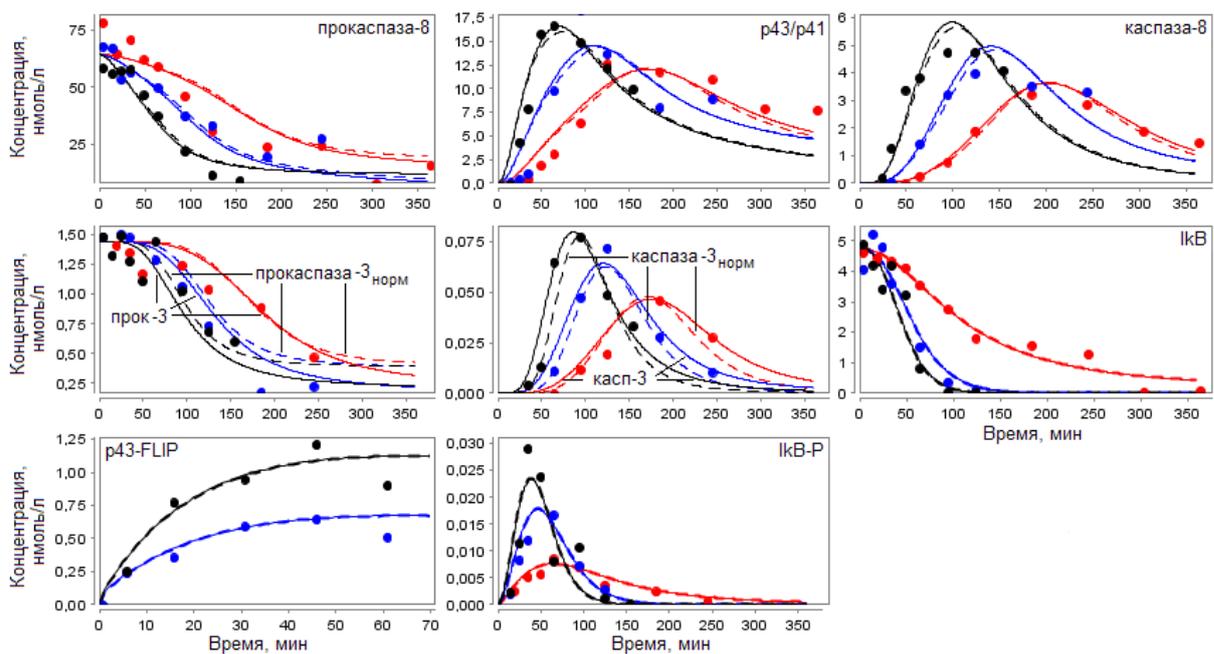
$$k_{p43-FLIP\_IKK} \cdot C_{IKK} \cdot C_{p43-FLIP}$$

и привели его к виду

$$k_{p43-FLIP\_IKK} \cdot C_{IKK}(0) \cdot C_{p43-FLIP},$$

где  $C_{IKK}(0)$  соответствует начальной концентрации белка ИКК.

Таким образом, мы сократили число белков модели с 23 до 20, реакций – с 23 до 18, а кинетических констант – с 17 до 15. На экспериментальную динамику переменных это не повлияло (рис. 4). На рис. 3Б приведено разбиение модели на модули.



**Рис. 4.** Сравнение экспериментальных данных L. Neumann и соавт. (точки) с результатами численного моделирования концентраций для редуцированной модели (сплошные линии) и объединенной модели (пунктирные линии). Данные были получены для трех концентраций anti-CD95: 1500 нг/мл (черный), 500 нг/мл (синий) и 250 нг/мл (красный). Относительные значения экспериментальных данных были пересчитаны (как и в случае модели M. Ventele и соавт.) для прокаспазы-3 и каспазы-3. Для остальных белков этого не делалось, т.к. отклонение между значениями, полученными для обеих моделей, было незначительно. Для указанных элементов вычисленные значения были нормированы с целью визуального восприятия графиков функций (нормировочный коэффициент – 0.1).

## ПОСТРОЕНИЕ ОБЪЕДИНЕННОЙ МОДЕЛИ АПОПТОЗА

Анализ сложности моделей Bentele и Neumann с помощью информационного критерия Акаике показал (табл. 1), что редуцированные модели более предпочтительны с точки зрения этого критерия, чем исходные модели. Разность между значениями коэффициентов  $AIC_{mean}$  (5) для этих моделей уменьшилась в ходе редукции на 60% по сравнению с исходным значением. Также из таблицы 1 видно, что модель Neumann лучше аппроксимирует экспериментальные данные, чем модель Bentele. Поэтому при объединении моделей мы взяли первую из них за основу.

**Таблица 1.** Сравнение моделей с помощью информационного критерия Акаике ( $AIC$ )

	Bentele с соавт.		Neumann с соавт.		Объединенная модель
	Исходная модель	Редуцированная модель	Исходная модель	Редуцированная модель	
$AIC$	182.46	138.83	201.58	198.17	318.10
$AIC_{mean}$	1.50	1.14	0.96	0.94	0.96

Поскольку экспериментальные данные для моделей были получены авторами на основе разных клеток (HeLa и SKW 6.4), мы использовали предположение о том, что кинетические параметры всех реакций, за исключением деградации белков, должны иметь одинаковые значения для обеих клеточных линий, а начальные концентрации веществ могут различаться. При рассмотрении процесса деградации мы учитывали, что его скорость определяется функцией  $k_{degrad} \cdot x_{apop\ activity}^2$ , где значение виртуальной переменной  $x_{apop\ activity}$  зависит от активности эффекторных каспаз [2]. В соответствии с рассуждениями Bentele и соавт., параметр  $k_{degrad}$  может принимать разные значения для высоких и пониженных концентраций CD95L. Мы дополнительно предположили, что деградация белков для разных клеток может регулироваться различными веществами и поэтому также характеризуется разными значениями указанного параметра.

Заметим, линия HeLa относится к клеткам типа II [11], в то время как клетки SKW 6.4 соответствуют типу I [2]. Различие между данными типами клеток заключается в том, что расщепление прокаспазы-3, индуцируемое каспазой-8, в первом случае является митохондриально-зависимым, а во втором не является [12]. Для того чтобы учесть этот факт, мы заменили реакцию nr15 в редуцированной модели Neumann и соавт. цепочкой, состоящей из трех реакций:



Первая реакция в (7) следует кинетике br7\* (рис 1B), вторая соответствует реакции br6\*, кинетический закон которой был изменен в соответствии с законом действующих масс с целью воспроизведения экспериментальной динамики каспазы-3, а последняя реакция совпадает с nr15 при замене каспазы-8 на каспазу-9.

Далее мы дополнили полученную модель реакцией ингибирования каспазы-3 посредством IAP и оценили параметры в этой реакции совместно с параметрами в (7), используя экспериментальные данные Neumann и соавт. Мы отследили последовательность преобразований, необходимых для соответствия динамики этой модели данным Bentele и соавт. для прокаспаз-3, -8, -9, каспазы-8, а также p43/p41 (табл. 2). Поскольку все преобразования (кроме шага с номером 4) касались изменения начальных концентраций белков, мы увеличили начальное значение прокаспазы-3 в модели Neumann и соавт. на порядок величины, и тем самым скорректировали изменения динамики концентраций на шаге 4, сохранив воспроизведение экспериментальных данных.

Для построения комплексной модели мы объединили модули активации каспазы-8 и NF-κB (рис. 3Б) с модулями активации каспазы-9 и инактивации PARP (рис. 1Б). С этой целью мы изменили последние два модуля, используя реакции (7), и произвели идентификацию необходимых параметров объединенной модели с учетом начальных концентраций, перечисленных в таблице 2, на основе данных Bentele и соавт. Для улучшения качества аппроксимации этих данных мы дополнили модель реакциями деградации прокаспазы-9, каспазы-9 и комплексов DISC:pro8, DISC:pro8:FLIPS.

Итоговая модель (рис. 5А-Б, приложение А) содержит 30 переменных, 38 реакций (15 из которых определяют процесс деградации) и 30 кинетических параметров. Модель показала хорошее соответствие между результатами вычислительных и натуральных экспериментов (рис. 2, 4), и согласно критерию Акаике (табл. 1) имеет тот же уровень сложности, что редуцированные модели Neumann и соавт., а также Bentele и соавт. Анализ средней чувствительности стационарных состояний модели на основе формулы (6) показал, что ее стационарные состояния для разных начальных концентраций лиганда отличаются от стационарных состояний первоначальных моделей и в целом являются более устойчивыми (приложение Б).

**Таблица 2.** Последовательность преобразований редуцированной модели Neumann и соавт., необходимая для воспроизведения экспериментальных данных Bentele и соавт.

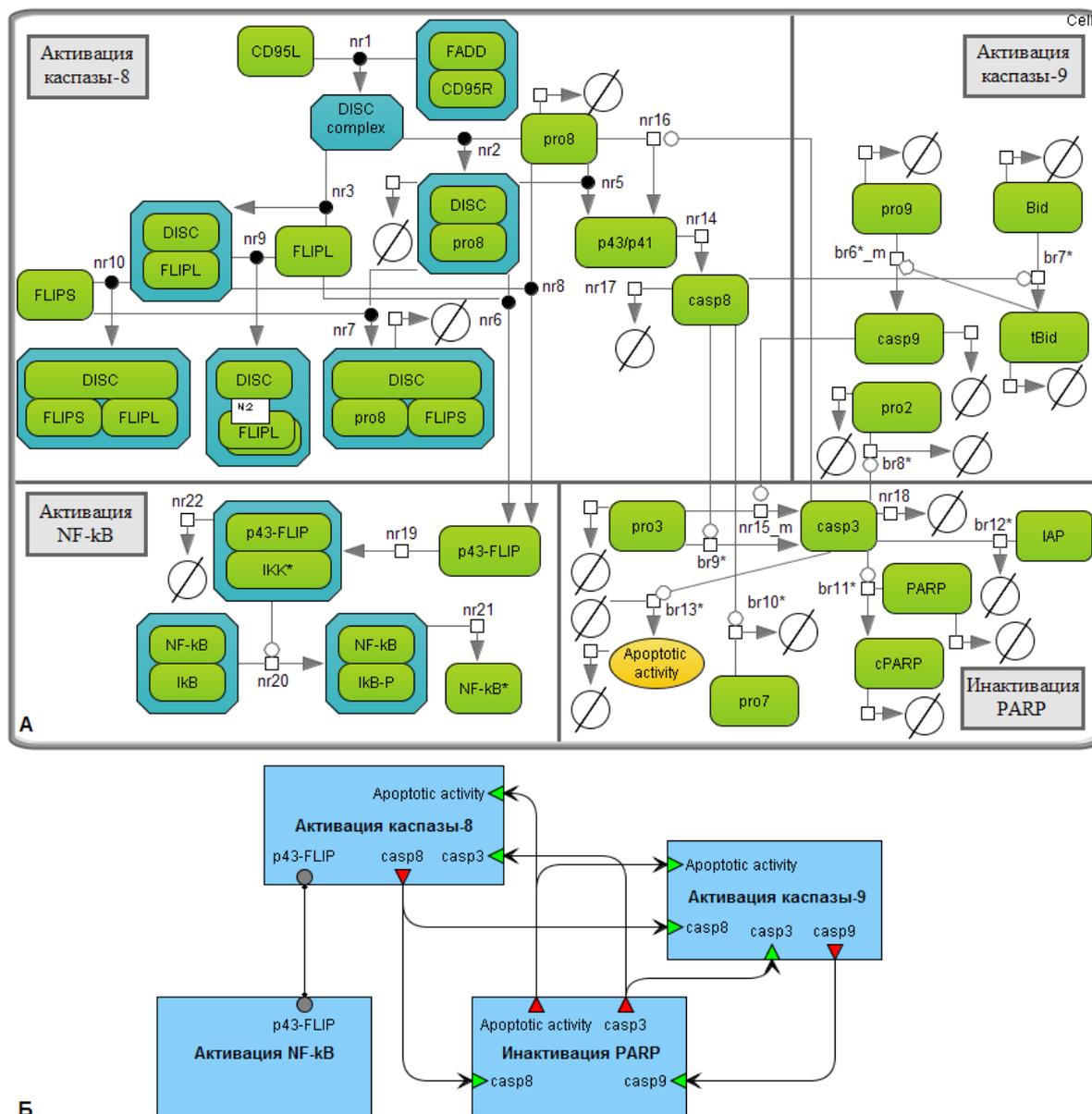
№	Преобразование	Начальное значение	Обоснование	Интервал и начальное значение для верификации
1	Увеличение начальной концентрации CD95R:FADD.	91.266	<i>Случай: anti-CD95 = 5 мкг/мл</i> Расщепление прокаспазы-8 должно происходить в течение 30 мин. Это возможно, только если концентрация DISC достигает уровня, достаточного для ускорения реакции nr2.	$[10^2, 10^3]$ , 442.821, Bentele <i>et al.</i>
2	Увеличение начальной концентрации прокаспазы-8	64.477	<i>Случай: anti-CD95 = 5 мкг/мл</i> Концентрация каспазы-8 должна достигать максимального значения приблизительно к двадцатой минуте.	$[10^2, 10^3]$ , 442.821, Bentele <i>et al.</i>
3	Увеличение начальной концентрации FLIPS	5.084	<i>Случай: anti-CD95 = 200 нг/мл</i> Как отмечалось в работе [3], активация каспазы-8 происходит в основном за счет каспазы-3 и поэтому запаздывает приблизительно на 30 мин. Поскольку реакции nr2 и nr5 имеют сравнимые скорости, мы не можем наблюдать это запаздывание. Для этого мы снижаем скорость nr5 посредством дополнительного ингибирования комплекса DISC:pro8.	$[10^1, 10^2]$ , 65.021, Bentele <i>et al.</i>
4	Уменьшение константы скорости реакции nr16 на порядок величины.	0.121	<i>Случай: anti-CD95 = 200 нг/мл</i> Предотвращение быстрого роста концентрации каспазы-8.	0.012
5	Переопределение начальной концентрации прокаспазы-3	1.443	<i>Случай: anti-CD95 = 5 мкг/мл</i> Улучшение аппроксимации экспериментальных данных.	$[10^0, 10^1]$ , 1.443, Neumann <i>et al.</i>
6	Увеличение начальных концентраций Bid и прокаспазы-9 до исходных значений в модели Bentele и соавт.	5.003 (Bid) 2.909 (pro9)	<i>Случай: anti-CD95 = 200 нг/мл</i> Воспроизведение экспериментальной динамики прокаспазы-9.	231.760 (Bid), 245.101 (pro9), Bentele <i>et al.</i>

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ РЕДУКЦИИ ДЛЯ ПОСТРОЕНИЯ КОМПЛЕКСНОЙ МОДЕЛИ АПОПТОТИЧЕСКИХ ПУТЕЙ

## АНАЛИЗ ПРЕДСКАЗАТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ ОБЪЕДИНЕННОЙ МОДЕЛИ АПОПТОЗА

Математическое моделирование клеточных процессов, как правило, направлено на формальное описание белковых взаимодействий, а также решение сопутствующих проблем, первая из которых связана с воспроизведением существующих экспериментальных данных, а вторая заключается в предсказании поведения системы в ответ на различные внешние и внутренние стимулы.

При рассмотрении моделей Bentele и соавт., а также Neumann и соавт., мы разделили предсказания, сформулированные авторами, на две группы: качественные и количественные.



**Рис. 5.** Объединенная модель сигнальных путей CD95 и NF-κB. **А.** Представление модели в формате SBGN. Реакции, имена которых начинаются с “nr”, взяты из модели Neumann и соавт., с “br” – из модели Bentele и соавт. Символ “\*” обозначает реакции редуцированных моделей. Индекс “m” указывает на реакции, измененные в ходе объединения моделей. **Б.** Модульное представление модели.

Первая группа характеризует белковые взаимодействия моделей. К этой группе мы отнесли предсказание Neumann и соавт. о том, что про- и антиапоптотические пути

CD95-индуцируемого апоптоза расходятся в комплексе DISC. Поскольку цепочка реакций, соответствующая этому факту, в ходе объединения моделей была сохранена, данное предсказание осталось в силе.

Вторая группа количественных предсказаний описывает поведение моделей в ответ на изменение начальных концентраций лиганда CD95L, рецептора CD95R, прокаспазы-8, белков cFLIPL и cFLIPS, а также ингибитора IAP. Анализ этой динамики для объединенной модели показал, что все предсказания, сформулированные Neumann и соавт., остались в силе (табл. 3). При этом поведение объединенной модели несколько отличается от поведения модели Ventele и соавт., оставаясь в согласии с экспериментальными данными этих авторов (табл. 4).

**Таблица 3.** Анализ предсказаний объединенной модели для клеток HeLa

№ <sup>1</sup>	Предсказания Neumann с соавт.	Динамика модели
1	Концентрация anti-CD95, необходимая для индукции апоптоза, составляет 30–100 нг/мл и не изменяется при уменьшении уровня CD95 в 12 раз. Время численного эксперимента – 60 часов.	
2	Понижение концентрации рецептора влечет ослабление сигнальных путей CD95 и NF-κB. Для подтверждения этого анализируется скорость расщепления каспазы-8 и деградации IκB-α после стимуляции клеток с помощью 500 нг/мл anti-CD95 при исходном (сплошные линии) и уменьшенном в 12 раз (пунктирные линии) уровне CD95.	
3	При увеличении концентрации антител anti-CD95 с 500 нг/мл до 1500 нг/мл концентрация p43/p41 достигает максимального уровня (пика) раньше, в то время как время пика p43-FLIP не изменяется.	
4	Увеличение концентрации cFLIPS сдерживает сигнальные пути CD95 и NF-κB. При этом генерация p43-FLIP ингибируется при более низком уровне cFLIPS, чем генерация p43/p41.	
5	Повышение cFLIPL ведет к резкому росту p43-FLIP. Пониженный уровень cFLIPL соответствует малому количеству p43-FLIP, но не влияет на уровень p43/p41. При очень высоких концентрациях cFLIPL белок p43-FLIP не генерируется, что не было подтверждено авторами экспериментально.	

6	Только средний уровень cFLIPL способствует активации NF-κB. Снижение концентрации прокаспазы-8 ведет к снижению уровня p43-FLIP и, следовательно, NF-κB. На рисунке показана логарифмическая зависимость максимальной концентрации NF-κB от начальных значений прокаспазы-8 и cFLIPL.	
7	Высокая концентрация cFLIPL также как и пониженная концентрация прокаспазы-8 ведут к устойчивому подавлению апоптоза. На рисунке показана та же зависимость, что и в предыдущем предсказании только для каспазы-3 вместо NF-κB.	

<sup>1</sup> Время численных экспериментов в 3–7 – 360 мин. Концентрация anti-CD95 в 4–7 – 1000 нг/мл.

**Таблица 4.** Предсказания моделей для клеток SKW 6.4

№ <sup>2</sup>	Экспериментальные наблюдения Bentele и соавт., предсказания моделей	Динамика моделей
1	<p><b>Эксперименты Bentele и соавт.:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– для 1 нг/мл anti-CD95 расщепление PARP не наблюдается;</li> <li>– для 10 нг/мл anti-CD95 смертность клеток составляет 20-30%.</li> </ul> <p><b>Исходная модель (красный):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– апоптотическая граница<sup>3</sup> – 1.9 нг/мл;</li> <li>– резкий рост cPARP при достижении anti-CD95 апоптотической границы.</li> </ul> <p><b>Объединенная модель (синий):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– апоптотическая граница – 3.5 нг/мл;</li> <li>– плавный рост cPARP с увеличением anti-CD95.</li> </ul>	
2	<p><b>Эксперименты Bentele и соавт.:</b> снижение регуляции cFLIP (на 70%) в клетках SKW 6.4 посредством добавления циклогексимида ведет к гибели клеток (40% за 1 день) уже при 1 нг/мл anti-CD95.</p> <p><b>Исходная (красный) и объединенная (синий) модели:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– апоптотическая граница чувствительна к концентрации cFLIP;</li> <li>– уменьшение концентрации cFLIP на 51% для исходной и 49% для объединенной модели ведет к клеточной гибели при 1 нг/мл anti-CD95.</li> </ul>	
3	<p><b>Эксперименты Bentele и соавт.:</b> в случае, когда уровень anti-CD95 составляет 10 нг/мл, рост концентрации каспазы-8 наблюдается более чем через 4 часа.</p> <p><b>Исходная (красный) и объединенная (синий) модели:</b> концентрации anti-CD95, немного превосходящие апоптотическую границу, способствуют значительной задержке в активации каспазы-8.</p> <p>На рисунке показана зависимость времени пика</p>	

	каспазы-8, превышающей 0.1% концентрации прокаспазы-8, от уровня anti-CD95.	
4	<p><b>Исходная модель:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– низкие концентрации IAP (не более 1 нмоль/л) ведут к полной гибели клеток;</li> <li>– высокие концентрации IAP предотвращают значительный рост каспазы-3 даже при высоких концентрациях лиганда.</li> </ul> <p><b>Объединенная модель:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>– низкие концентрации IAP (не более 1 нмоль/л) блокируют апоптоз при уровне CD95L, не превосходящем 0.3 нмоль/л;</li> <li>– высокие концентрации CD95L ведут к клеточной гибели.</li> </ul> <p>На рисунках показана логарифмическая зависимость максимальной концентрации каспазы-3 от начальных значений IAP и CD95L.</p>	

<sup>2</sup>Время численных экспериментов во всех предсказаниях – 2880 мин. (2 дня).

<sup>3</sup>Апоптотическая граница соответствует концентрации anti-CD95, для которой уровень cPARP превышает 10% от начальной концентрации PARP [13].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе описан процесс объединения двух математических моделей регуляции апоптоза, характеризующих сигнальные пути рецептора CD95 и транскрипционного фактора NF-κB. Этот подход включает редукцию моделей на основе экспериментальной динамики заданного числа переменных и подробный анализ ключевых элементов (белков, реакций и т. д.), определяющих эту динамику.

Изложенный материал является первым шагом в направлении верификации модульной модели апоптоза, построенной ранее [14].

ПРИЛОЖЕНИЕ А.

ОПИСАНИЕ ОБЪЕДИНЕННОЙ МОДЕЛИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ CD95 И NF-κB

Таблица А1. Список реакций (за исключением реакций деградации) модели

№	Реакции	Кинетические законы	Константы скоростей, (нмоль/л) <sup>-1</sup> мин <sup>-1</sup> , мин <sup>-1</sup>
nr1	CD95L + CD95R:FADD → DISC	$n\_k1 \cdot C_{CD95L} \cdot C_{CD95R}$	1.000
nr2	pro8 + DISC → DISC:pro8	$n\_k2 \cdot C_{DISC} \cdot C_{pro8}$	1.277E-4
nr3	DISC + FLIPL → DISC:FLIPL	$n\_k3 \cdot C_{DISC} \cdot C_{FLIPL}$	0.669
nr5	DISC:pro8 + pro8 → 2 x p43p41	$n\_k5 \cdot C_{DISC:pro8} \cdot C_{pro8}$	5.947E-4
nr6	DISC:pro8 + FLIPL → p43-FLIP	$n\_k6 \cdot C_{DISC:pro8} \cdot C_{FLIPL}$	0.999
nr7	DISC:pro8 + FLIPS → DISC:pro8:FLIPS	$n\_k7 \cdot C_{DISC:pro8} \cdot C_{FLIPS}$	0.888
nr8	DISC:FLIPL + pro8 → p43FLIP	$n\_k5 \cdot C_{DISC:FLIPL} \cdot C_{pro8}$	5.947E-4
nr9	DISC:FLIPL + FLIPL → DISC:FLIPL <sub>2</sub>	$n\_k6 \cdot C_{DISC:FLIPL} \cdot C_{FLIPL}$	0.999
nr10	DISC:FLIPL + FLIPS → DISC:FLIPL:FLIPS	$n\_k7 \cdot C_{DISC:FLIPL} \cdot C_{FLIPS}$	0.888
nr14	2 x p43p41 → casp8	$n\_k8 \cdot C_{p43p41} \cdot C_{p43p41}$	8.044E-4
nr15_m	pro3 -casp9 → casp3	$n\_k9 \cdot C_{casp9} \cdot C_{pro3}$	0.049
nr16	pro8 -casp3 → p43p41	$n\_k10 \cdot C_{pro8} \cdot C_{casp3}$	0.012
nr19	p43FLIP → p43-FLIP:IKK*	$n\_k13 \cdot IKK_0 \cdot C_{p43FLIP}$	$n\_k13 = 7.204E-4$ , $IKK_0 = 5.773$
nr20	NF-κB:IκB -p43-FLIP:IKK → NF-κB:IκB-P	$n\_k14 \cdot C_{NF-κB:IκB} \cdot C_{p43-FLIP:IKK}$	0.359
nr21	NF-κB:IκB-P → NF-κB*	$n\_k15 \cdot C_{NF-κB:IκB-P}$	3.684
br6*_m	pro9 -tBid → casp9	$b\_k6 \cdot C_{tBid} \cdot C_{pro9}$	0.063
br7*	Bid -casp8 → tBid	$b\_k7 \cdot C_{casp8} \cdot C_{Bid}$	6.0E-4
br8*	pro2 -casp3 →	$b\_k8 \cdot C_{casp3} \cdot C_{pro2} / (b\_Km8 + C_{pro2})$	$b\_k8 = 15.631$ , $b\_Km8 = 55.574$
br9*	pro3 -casp8 → casp3	$b\_k9 \cdot C_{casp8} \cdot C_{pro3} / (b\_Km9 + C_{pro3})$	$b\_k9 = 0.0$ (HeLa) или 0.027 (SKW 6.4), $b\_Km9 = 1.035$
br10*	pro7 -casp8 →	$b\_k10 \cdot C_{casp8} \cdot C_{pro7}$	10.895
br11*	PARP -casp3 → cPARP	$b\_k11 \cdot C_{casp3} \cdot C_{PARP}$	73.496
br12*	casp3 + IAP →	$b\_k12 \cdot C_{casp3} \cdot C_{IAP}$	0.01
br13*	-casp3 → Apoptotic activity	$b\_k13 \cdot (1.0 - x_{apopt activity}) \cdot C_{casp3}$	5956.810

Таблица А2. Список реакций деградации модели

Деградирующие белки (DP)	Кинетические законы	Константы скоростей (мин <sup>-1</sup> )
pro2, pro3, pro8, DISC:pro8, pro9, Bid, PARP, DISC:pro8:FLIPS	$d \cdot x_{apopt activity}^2 \cdot C_{DP}$	$d = \begin{cases} 0.0, HeLa; \\ 0.0542, C_{CD95L} = 5 \mu\text{M} / \text{мл}, \text{SKW } 6.4; \\ 0.0084, C_{CD95L} = 200 \text{ нг} / \text{мл}, \text{SKW } 6.4; \\ 0.0028, 1 \text{ нг} / \text{мл} \leq C_{CD95L} \leq 100 \text{ нг} / \text{мл}, \text{SKW } 6.4, \end{cases}$
casp3	$(d \cdot x_{apopt activity}^2 + n\_k12) \cdot C_{casp3}$	$n\_k12 = 0.150$
casp8	$(d \cdot x_{apopt activity}^2 + n\_k11) \cdot C_{casp8}$	$n\_k11 = 0.029$
casp9	$(d \cdot x_{apopt activity}^2 + d_{casp9}) \cdot C_{casp9}$	$d_{casp9} = 0.100$
cPARP	$d_{cPARP} \cdot C_{cPARP}$	0.017
tBid	$d_{tBid} \cdot C_{tBid}$	0.050
p43-FLIP:IKK*	$n\_k16 \cdot C_{p43-FLIP:IKK}$	0.022
Apoptotic activity ( $x_{apopt activity}$ )	$d_{apopt activity} \cdot C_{Apoptotic activity}$	0.002

**Таблица А3.** Список ненулевых значений начальных концентраций модели

Белки	Начальные концентрации (нмоль/л)			
	Клетки HeLa	Клетки SKW 6.4	Объединенная модель Клетки HeLa	Объединенная модель Клетки SKW 6.4
CD95L	113.22, 37.74, 18.87	1990.0, 79.6	113.22, 37.74, 18.87	1990.0, 79.6
CD95R	–	442.821	–	–
CD95R:FADD	91.266	0.000	91.266	611.689
прокаспаза-2	–	157.644	157.644	157.644
прокаспаза-3	1.443	112.454	14.434	2.344
прокаспаза-7	–	18.793	18.793	18.793
прокаспаза-8	64.477	442.821	64.477	350.025
прокаспаза-9	–	245.101	2.909	245.101
FLIPL	7.399	65.021	7.399	7.399
FLIPS	5.084	65.021	5.084	70.449
IAP	–	12.216	1.222	1.222
Bid	–	231.760	5.003	231.760
IKK	5.773	–	5.773	5.773
NF-κB:IκB	4.740	–	4.740	4.740
PARP	–	11.162	11.162	11.162

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

**Таблица Б1.** Анализ стационарных состояний исходной и редуцированной моделей Bentele и соавт., а также объединенной модели

Белки	Стационарные состояния anti-CD95 = 200 нг/мл			Стационарные состояния anti-CD95 = 5 мкг/мл		
	Исходная модель	Редуцир. модель	Объединенная модель	Исходная модель	Редуцир. модель	Объединенная модель
прокаспаза-2	0.0000374	0.0000316	2.4468579	0.0013440	0.0013602	0.0000096
прокаспаза-3	–	–	–	0.0	0.0	0.0
прокаспаза-7	–	–	–	0.0	0.0	0.0
прокаспаза-8	25.1700455	27.2240392	14.9514288 (сумм. конц.)	0.0000016	0.0	0.0000367 (сумм. конц.)
прокаспаза-9	0.0	0.0	0.0	–	–	–
каспаза-8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
p43/p41	0.0	0.0	0.0001051	–	–	–
Bid	–	–	–	0.0411840	0.0342991	0.0000298
tBid	–	–	–	0.0901602	0.1040935	0.0
PARP	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
cPARP	–	–	–	0.0	0.0	0.0

**Таблица Б2.** Анализ стационарных состояний исходной (И) и редуцированной (Р) моделей Neumann и соавт., а также объединенной (О) модели

Белки	Стационарные состояния, anti-CD95 = 1500 нг/мл			Стационарные состояния, anti-CD95 = 500 нг/мл			Стационарные состояния, anti-CD95 = 250 нг/мл		
	И	Р	О	И	Р	О	И	Р	О
про-8 (сумм)	12.0752771	12.0751903	12.0181928	2.6562426	2.6562649	2.3208092	9.6046242	9.6052138	13.2926881
p43/p41	0.0010204	0.0010204	0.0000891	0.0009555	0.0009555	0.0000948	0.0008922	0.0008922	0.0000883
касп-8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
про-3	0.1992635	0.1992525	3.8521010	0.1350020	0.1349977	3.7249153	0.1721551	0.1721569	3.8516549
касп-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IkB	0.0	0.0	0.0	0.0000020	0.0000020	0.0000020	0.1519007	0.1526973	0.1526973
IkB-P	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
p43- FLIP	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

**Таблица Б3.** Анализ средней чувствительности стационарных состояний всех исследуемых моделей при возмущении параметров<sup>†</sup>

Клетки, Концентрация anti-CD95	Bentele и соавт.		Neumann и соавт.		Объединенная модель
	Исходная модель	Редуцир. модель	Исходная модель	Редуцир. модель	
SKW 6.4, 5 мкг/мл	–34.49 (–33.79)	–29.72	–	–	–146.84
SKW 6.4, 200 нг/мл	–25.64 (–24.95)	–38.97	–	–	–114.13
HeLa, 1500 нг/мл	–	–	–30.71 (–30.42)	–30.29	–30.21
HeLa, 500 нг/мл	–	–	–79.85 (–79.52)	–78.94	–79.88
HeLa, 250 нг/мл	–	–	–88.05 (–87.60)	–88.70	–97.69

<sup>†</sup> Для исходных моделей была посчитана средняя чувствительность при возмущении всех параметров и параметров, сохранившихся в ходе редукции (значение в скобках).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. MacFarlane M., Williams A.C. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Reports*. 2004. V. 5. P. 674–678.
2. 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. *The Journal of Cell Biology*. 2004. V. 166. № 9. P. 839–851.
3. Кутумова Е.О. Редукция модели CD95-индуцируемого апоптоза. *Математическая биология и биоинформатика*. 2012. Т. 7. № 1. С. 139–151.
4. Neumann L., Pforr C., Beaudouin J., Pappa A., Fricker N., Krammer P.H., Lavrik I.N., Eils R. Dynamics within the CD95 death-inducing signaling complex decide life and death of cells. *Molecular Systems Biology*. 2010. V. 6. № 352.
5. Коган В.Е., Зенин Г.С., Пенкина Н.В. *Физическая химия. Часть 2. Химическая кинетика*. Санкт–Петербург : СЗТУ, 2005.
6. Hoops S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singhal M., Xu L., Mendes P., Kummer U. COPASI – a COMplex PATHway SIMulator. *Bioinformatics*. 2006. № 22. С. 3067–3074.
7. 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. № 30.
8. 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. № 334.
9. Gorban A.N., Radulescu O., Zinovyev A.Y. Asymptotology of Chemical Reaction Networks. *Chemical Engineering Science*. 2009. V. 65. P. 2310–2324.
10. Le Novère N., Hucka M., Mi H., Moodie S., Schreiber F., Sorokin A., Demir E., Wegner K., Aladjem M.I., Wimalaratne S.M. *et al.* The Systems Biology Graphical Notation. *Nature Biotechnology*. 2009. V. 27. № 8. P. 735–741.
11. Engels I.H., Stepczynska A., Stroh C., Lauber K., Berg C., Schwenzler R., Wajant H., Jänicke R.U., Porter A.G., Belka C., Gregor M., Schulze-Ostho K., Wesselborg K. Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene*. 2000. V. 19. P. 4563–4573.
12. Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A., Friesen C., Li F., Tomaselli K.J., Debatin K.-M., Krammer P.H., Peter M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal*. 1998. V. 17. № 6. P. 1675–1687.
13. Gaudet S., Spencer S.L., Chen W.W., Sorger P.K. Exploring the contextual sensitivity of factors that determine cell-to-cell variability in receptor-mediated apoptosis. *PLoS Computational Biology*. 2012. V. 8. № 4. e1002482.
14. Kutumova E.O., Kiselev I.N., Sharipov R.N., Lavrik I.N., Kolpakov F.A. A modular model of the apoptosis machinery. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012. V. 736. № 2. P. 235–245.

Материал поступил в редакцию 02.10.2012, опубликован 01.11.2012.