



σχολήχημικώνμηχανικών
εθνικόμετσόβιοπολυτεχνείο

Γενετικά ρυθμιστικά δίκτυα

Γενετικά ρυθμιστικά δίκτυα

Γενετικά ρυθμιστικά δίκτυα (Gene regulatory network, GRN): σύνολο μοριακών ρυθμιστών στο εσωτερικό κυττάρου, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και με άλλα συστατικά του κυττάρου επηρεάζοντας το ρυθμό με τον οποίο γονίδια μεταγράφονται σε mRNA και συνεπακόλουθα το ρυθμό παραγωγής πρωτεϊνών.

Οι μοριακοί ρυθμιστές μπορούν να είναι: DNA, RNA, πρωτεΐνες ή σύνθετα αυτών. Κάθε μόριο mRNA αντιστοιχεί σε μια συγκεκριμένη πρωτεΐνη (ή σύνολο πρωτεϊνών).

Πρωτεΐνες: δίνουν συγκεκριμένες δομικές ιδιότητες
δρουν σαν ένζυμα
ενεργοποιούν άλλα γονίδια (transcription factors)

Γενετικά ρυθμιστικά δίκτυα

- Μονοκύτταροι οργανισμοί: GRN αποκρίνονται στο εξωτερικό περιβάλλον τους για να εξασφαλίσουν τη βέλτιστη λειτουργία των κυττάρων στο περιβάλλον αυτό.

π.χ. ζυμομύκητες (yeast cells) σε περιβάλλον σακχάρων ενεργοποιούν τα γονίδια που παράγουν ένζυμα για τη μετατροπή σακχάρων σε αλκοόλη (παραγωγή ενέργειας για τα κύτταρα).

- Πολυκύτταροι οργανισμοί: εφαρμόζεται η ίδια αρχή για την ενεργοποίηση σειράς γονιδιακών ενεργοποιήσεων που οδηγούν τελικά στον έλεγχο μορφολογικών χαρακτηριστικών.

Morphogen gradients: “ενημερώνουν” τα κύτταρα για τη θέση τους στον οργανισμό και βοηθούν στον να προσδιορίσουν τον τύπο τους (embryogenesis)

Γενετικά ρυθμιστικά δίκτυα - Μοντελοποίηση

- Συστήματα συνήθων διαφορικών εξισώσεων

GRN: σειρά ενδοκυτταρικών αντιδράσεων

Εξάγεται η δυναμική συμπεριφορά των χημικών ειδών που συμμετέχουν σε αυτές και διατυπώνεται ως μια συνήθης διαφορική εξίσωση:

$$\frac{dS_j}{dt} = f_j(S_1, S_2, \dots, S_N)$$

S_j : Η συγκέντρωση του χημικού είδους

Μη γραμμική δυναμική: ανίχνευση κρίσιμων τιμών παραμέτρων (π.χ. εξωκυτταρικών συγκεντρώσεων), όπου με μικρές διαταραχές η κατάσταση του κυττάρου διαφοροποιείται σημαντικά

Γενετικά ρυθμιστικά δίκτυα - Μοντελοποίηση

- Λογικά μοντέλα (boolean networks)

Περιγράφουν ποιοτικά τα ρυθμιστικά δίκτυα: κατανόηση διαφορετικών λειτουργιών δικτύου κάτω από διαφορετικές συνθήκες.

Οι θέσεις κάθε κόμβου (γονίδιο-πρωτεΐνη-μικρά μόρια) έχει διακριτές τιμές (on-off, Boolean networks)

Probabilistic boolean networks: περισσότερες από δύο καταστάσεις (δίνουν την πιθανότητα να είναι σε μια κατάσταση)

Γενετικά ρυθμιστικά δίκτυα - Μοντελοποίηση

- Στοχαστικά μοντέλα

Η γονιδιακή έκφραση είναι μια στοχαστική διεργασία.

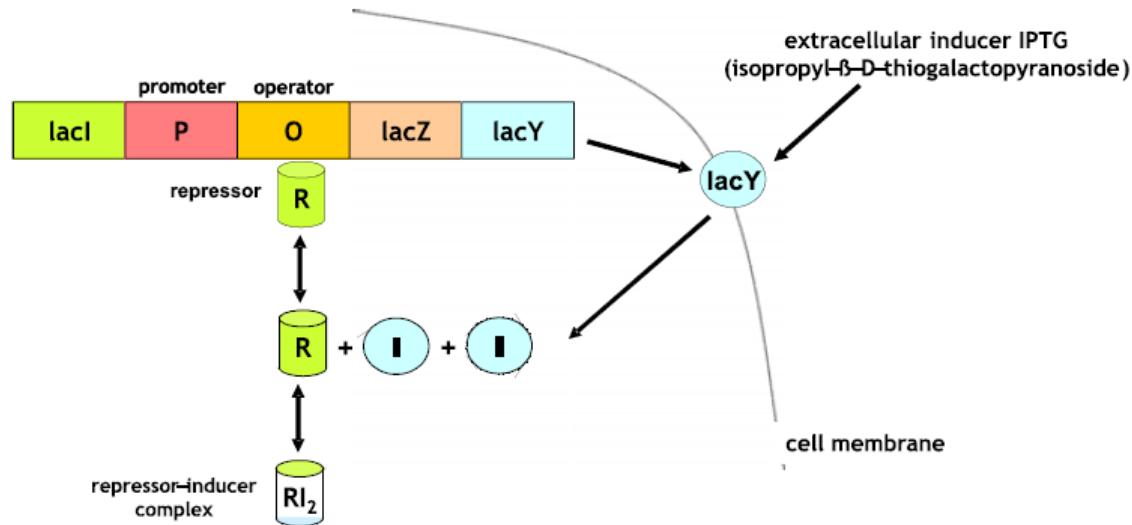
- Στοχαστικές διαφορικές εξισώσεις

$$dX_t = \mu(X_t, t)dt + \sigma(X_t, t)dW_t$$

W : Wiener process (Brownian motion)

- Gillespie's stochastic simulation algorithm

Lac Operon



(Kepler and Elston, 2001, Kavousanakis et al 2009)

Κωδικοποιεί τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για το μεταβολισμό της λακτόζης.

Γονίδιο *lac Y*: κωδικοποιεί την πρωτεΐνη *lac permease* που συμβάλλει στη μεταφορά της λακτόζης (ή ανάλογης ένωσης) στο εσωτερικό του κυττάρου.

Καταστολέας *lac I*: συνδέεται στο χειριστή (operator) και αποτρέπει τη σύνδεση της RNA πολυμεράσης.

Παρουσία λακτόζης: μεταφορά στο κύτταρο και σύνδεση με τον καταστολέα απελευθερώνοντας περιοχές του χειριστή, επιτρέποντας έτσι την περαιτέρω έκφραση των γονιδίων.

Lac Operon

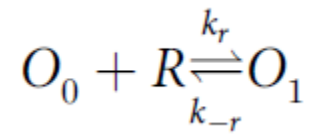
Promoter: *lacP*

Operator: *lacO* (O_0 : free sites, O_1 : occupied sites)

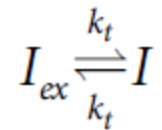
Genes: *lacZ*, *lacY*, *lacA*

Repressor: *lacI* (R)

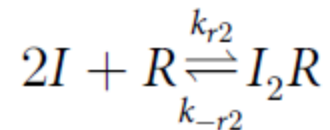
- Repressor binds to and unbinds from occupied and free operator sites



- The extracellular IPTG inducer, I_{ex} , is transported through the cell membrane

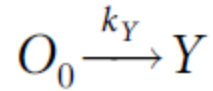


- Binding of intracellular IPTG, I , to repressor through bimolecular reaction and unbinding

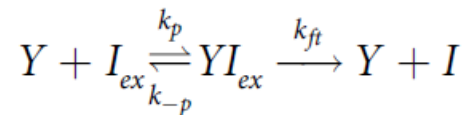


Lac Operon

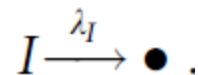
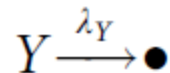
- *lac permease*, Y , production proportional to the amount of free operator sites



- *lac permease* facilitates IPTG transport (plays role of substrate following Michaelis-Menten kinetics)



- Degradation of *lac permease* and inducer



Lac Operon

Ντετερμινιστικό μοντέλο (Συνήθειες Διαφορικές Εξισώσεις)

lac permease:

$$\frac{d[Y]}{dt} = k_Y[O_o] - k_p[Y][I_{ex}] + (k_{-p} + k_{ft})[YI_{ex}] - \lambda_Y[Y]$$

lac permease / inducer complex:

$$\frac{d[YI_{ex}]}{dt} = k_p[Y][I_{ex}] - (k_{-p} + k_{ft})[YI_{ex}]$$

Inducer:

$$\frac{d[I]}{dt} = k_t[I_{ex}] - \frac{1}{2}k_{r2}[I]^2[R] + \frac{1}{2}k_{-r2}[I_2R] + k_{ft}[YI_{ex}] - \lambda_I[I]$$

Repressor:

$$\frac{d[R]}{dt} = -k_r[O_o][R] + k_{-r}[O_1] - k_{r2}[I]^2[R] + k_{-r2}[I_2R]$$

Free operator sites:

$$\frac{d[O_o]}{dt} = -k_r[O_o][R] + k_{-r}[O_1] - k_Y[O_o]$$

Lac Operon

Constant number of operator sites: $O_T = O_o + O_1$ and repressor molecules:
 $R_T = R + I_2R$

lac permease:

$$\frac{d[Y]}{dt} = k_Y[O_o] - k_p[Y][I_{ex}] + (k_{-p} + k_{ft})[YI_{ex}] - \lambda_Y[Y]$$

lac permease / inducer complex:

$$\frac{d[YI_{ex}]}{dt} = k_p[Y][I_{ex}] - (k_{-p} + k_{ft})[YI_{ex}]$$

Inducer:

$$\frac{d[I]}{dt} = k_t[I_{ex}] - \frac{1}{2}k_{r2}[I]^2[R] + \frac{1}{2}k_{-r2}([R_T] - [R]) + k_{ft}[YI_{ex}] - (\lambda_I + k_t)[I]$$

Repressor:

$$\frac{d[R]}{dt} = -k_r[O_o][R] + k_{-r}([O_T] - [O_o]) - k_{r2}[I]^2[R] + k_{-r2}([R_T] - [R])$$

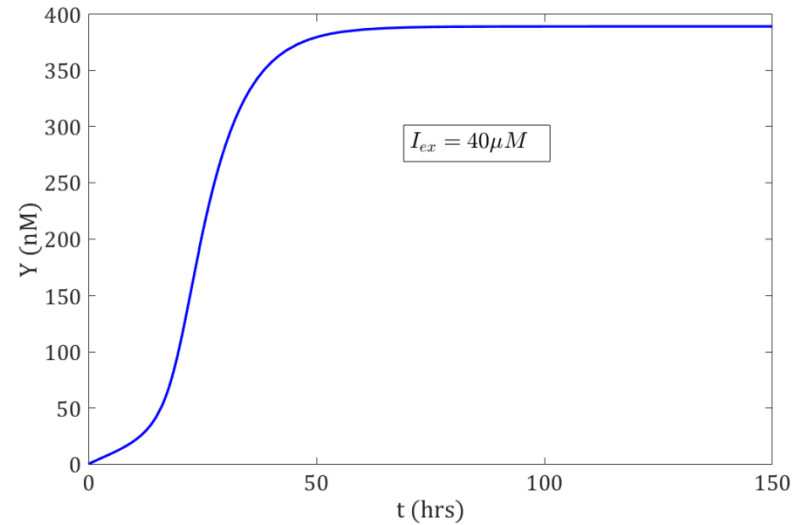
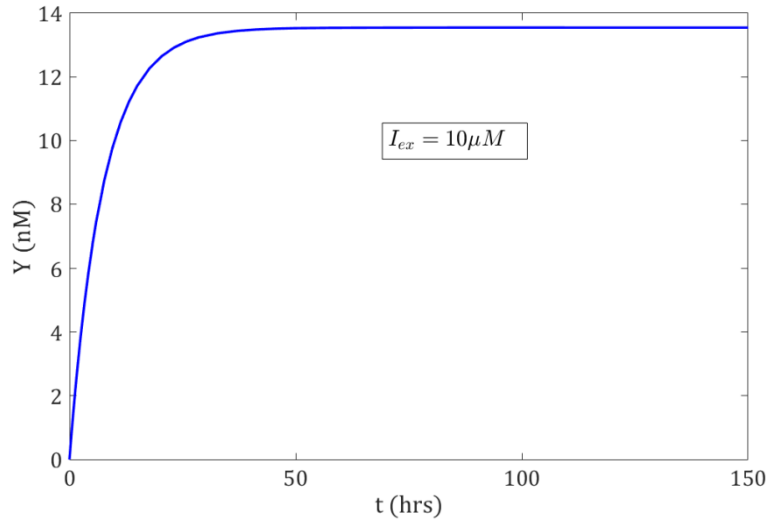
Free operator sites:

$$\frac{d[O_o]}{dt} = -k_r[O_o][R] + k_{-r}([O_T] - [O_o]) - k_Y[O_o]$$

Lac Operon

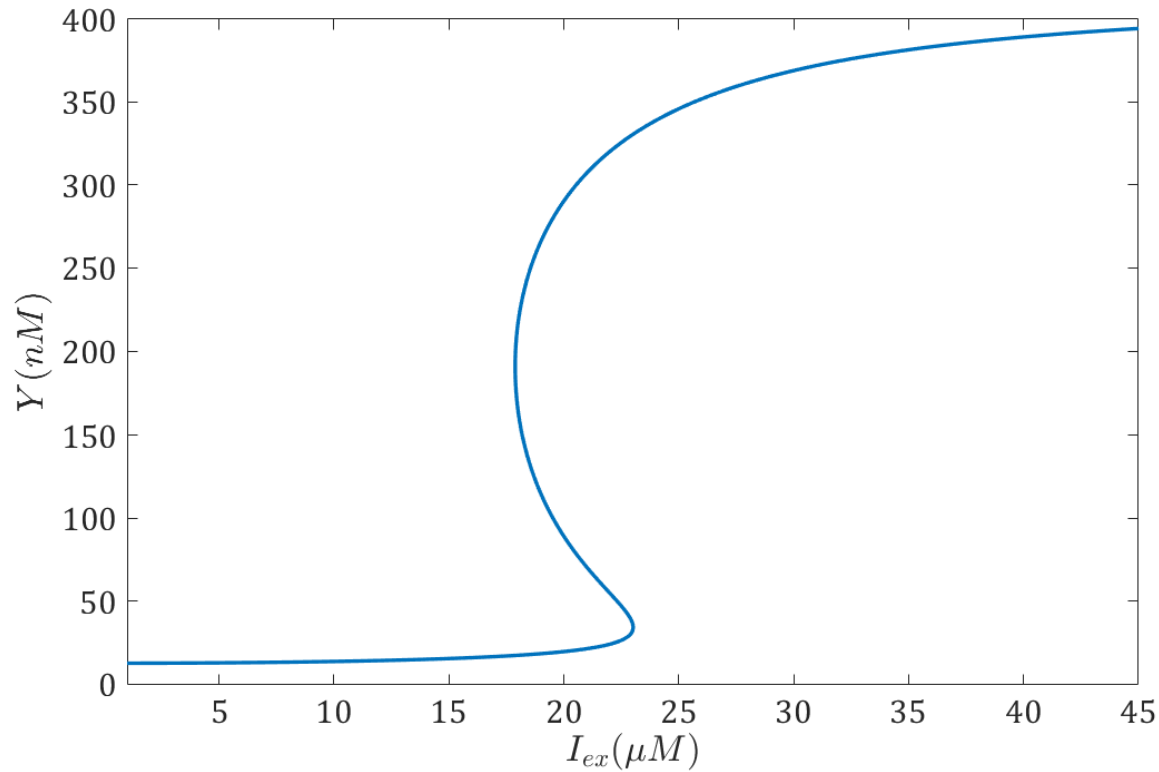
Symbol	Value
O_T	2.08 nM
R_T	2.0208 nM
k_Y	0.5 min^{-1}
k_{r2}	$3 \times 10^{-7} \text{ nM}^{-2} \text{ min}^{-1}$
k_{-r2}	$3 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$
k_r	$960 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$
k_{-r}	60 min^{-1}
k_p	$1.32 \text{ nM}^{-1} \text{ min}^{-1}$
k_{-p}	$6 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$
k_{ft}	$6 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$
λ_Y	0.0025 min^{-1}
λ_I	0.0025 min^{-1}
k_t	0.82 min^{-1}

Lac Operon



Δυναμική εξέλιξη της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης *lac permease* για διαφορετικές συγκεντρώσεις εξωκυτταρικού ενεργοποιητή.

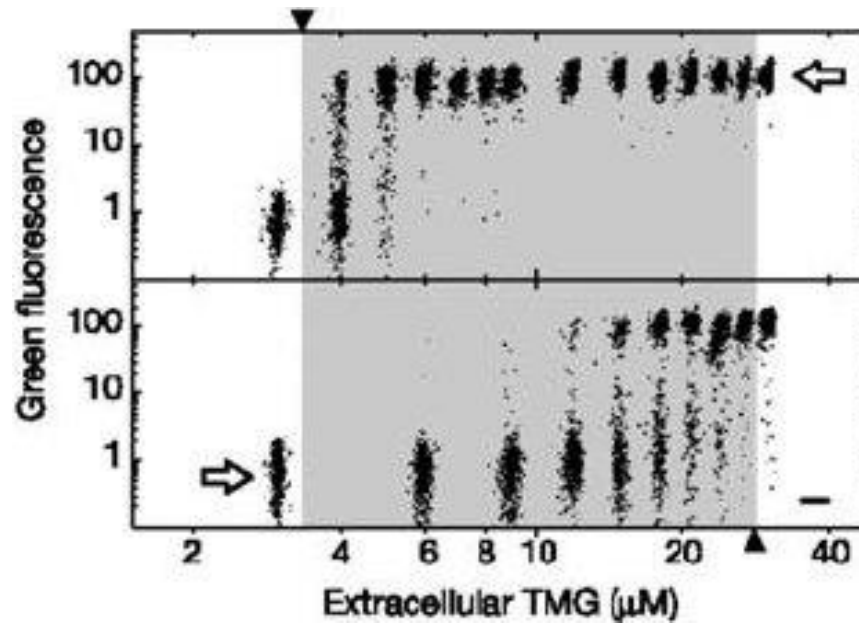
Lac Operon



Λύσεις μόνιμης κατάστασης της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης *lac permease* για διαφορετικές συγκεντρώσεις εξωκυτταρικού ενεργοποιητή.

Περιοχή με πολλαπλότητα λύσεων !!

Lac Operon



(Narang & Pilyugin, Bull. Math. Biol. 70, 2008)

Στοχαστική Προσομοίωση

Ο αριθμός των μορίων που συμμετέχουν στις ενδοκυτταρικές αντιδράσεις είναι πολύ μικρός => ντετερμινιστικές εξισώσεις δεν μπορούν να αποδώσουν με ακρίβεια τη δυναμική του φαινομένου.

Εναλλακτική προσέγγιση: λαμβάνοντας υπόψη το στοχαστικό και διακριτό χαρακτήρα κάθε μιας από τις χημικές αντιδράσεις.

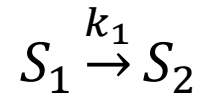
Στοχαστική Προσομοίωση – Gillespie's algorithm

Αλγόριθμος Gillespie (Gillespie, J. Comp. Phys., 1976 & Gillespie, J. Phys. Chem., 1977)

- Αρχικοποίηση αριθμού μορίων για κάθε χημικό είδος
- Υπολογισμός πιθανότητας πραγματοποίησης κάθε χημικής αντίδρασης (Propensities), R_i
- Γένεση δύο τυχαίων αριθμών στο διάστημα (0,1): r_1, r_2
- Το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι την πραγματοποίηση του επόμενου συμβάντος: $\Delta t = \frac{1}{\sum_i R_i} \ln\left(\frac{1}{r_1}\right)$
- Επιλογή συμβάντος σύμφωνα με την πιθανότητα πραγματοποίησής της
- Ανανέωση αριθμού μορίων (σύμφωνα με το συμβάν)

Στοχαστική Προσομοίωση – Gillespie's algorithm

Έστω η χημική αντίδραση:



Η πιθανότητα να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σε ένα απειροστά μικρό χρονικό διάστημα, δt , είναι: $X_1 c_1 \delta t$, όπου X_1 ο αριθμός μορίων της ουσίας, S_1 και c_1 παράμετρος της χημικής αντίδρασης.

Ο μέσος ρυθμός πραγματοποίησης μιας χημικής αντίδρασης είναι: $\langle X_1 \rangle c_1$ (μόρια ουσίας / χρόνο)

Από τη χημική κινητική: $R_i = k_1 [S_1]$, όπου $[S_1]$ γραμμομοριακή συγκέντρωση (mol / V) και R_i ο ρυθμός της αντίδρασης (mol/όγκο/χρόνο)

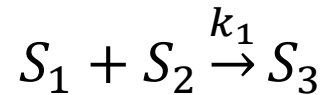
Σε μονάδες [μόρια ουσίας / χρόνος] ο ρυθμός της αντίδρασης είναι ο: $R_i (N_A V)$, όπου N_A ο αριθμός Avogadro ($N_A = 6,022 \cdot 10^{23}$ μόρια/mol)

$$\text{Συνεπώς: } R_i N_A V = k_1 [S_1] N_A V = \langle X_1 \rangle c_1 \rightarrow k_1 \langle X_1 \rangle \frac{N_A V}{N_A V} = \langle X_1 \rangle c_1$$

$$\text{Συνεπώς: } \boxed{k_1 = c_1}$$

Στοχαστική Προσομοίωση – Gillespie's algorithm

Έστω η χημική αντίδραση:



Η πιθανότητα να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σε ένα απειροστά μικρό χρονικό διάστημα, δt , είναι: $X_1 X_2 c_1 \delta t$, όπου X_i ο αριθμός μορίων της ουσίας, S_i .

Ο μέσος ρυθμός πραγματοποίησης μιας χημικής αντίδρασης είναι: $\langle X_1 X_2 \rangle c_1$ (μόρια ουσίας / χρόνο)

Από τη χημική κινητική: $R_i = k_1 [S_1][S_2]$, όπου $[S_i]$ γραμμομοριακή συγκέντρωση (mol / V) και R_i ο ρυθμός της αντίδρασης (mol/όγκο/χρόνο)

Σε μονάδες [μόρια ουσίας / χρόνος] ο ρυθμός της αντίδρασης είναι ο:

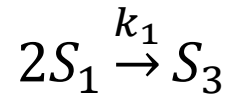
$R_i (N_A V)$, όπου N_A ο αριθμός Avogadro ($N_A = 6,022 \cdot 10^{23}$ μόρια/mol)

Συνεπώς: $R_i N_A V = k_1 [S_1][S_2] N_A V = \langle X_1 X_2 \rangle c_1 \rightarrow k_1 \langle X_1 \rangle \langle X_2 \rangle \frac{1}{N_A V} = \langle X_1 X_2 \rangle c_1$

Για ντεντερμινιστικές εκφράσεις: $\langle X_1 \rangle \langle X_2 \rangle = \langle X_1 X_2 \rangle \rightarrow \boxed{k_1 = N_A V c_1}$

Στοχαστική Προσομοίωση – Gillespie's algorithm

Έστω η χημική αντίδραση:



Η πιθανότητα να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σε ένα απειροστά μικρό χρονικό διάστημα, δt , είναι: $\frac{X_1(X_1-1)}{2} c_1 \delta t$, όπου X_1 ο αριθμός μορίων της ουσίας, S_1 .

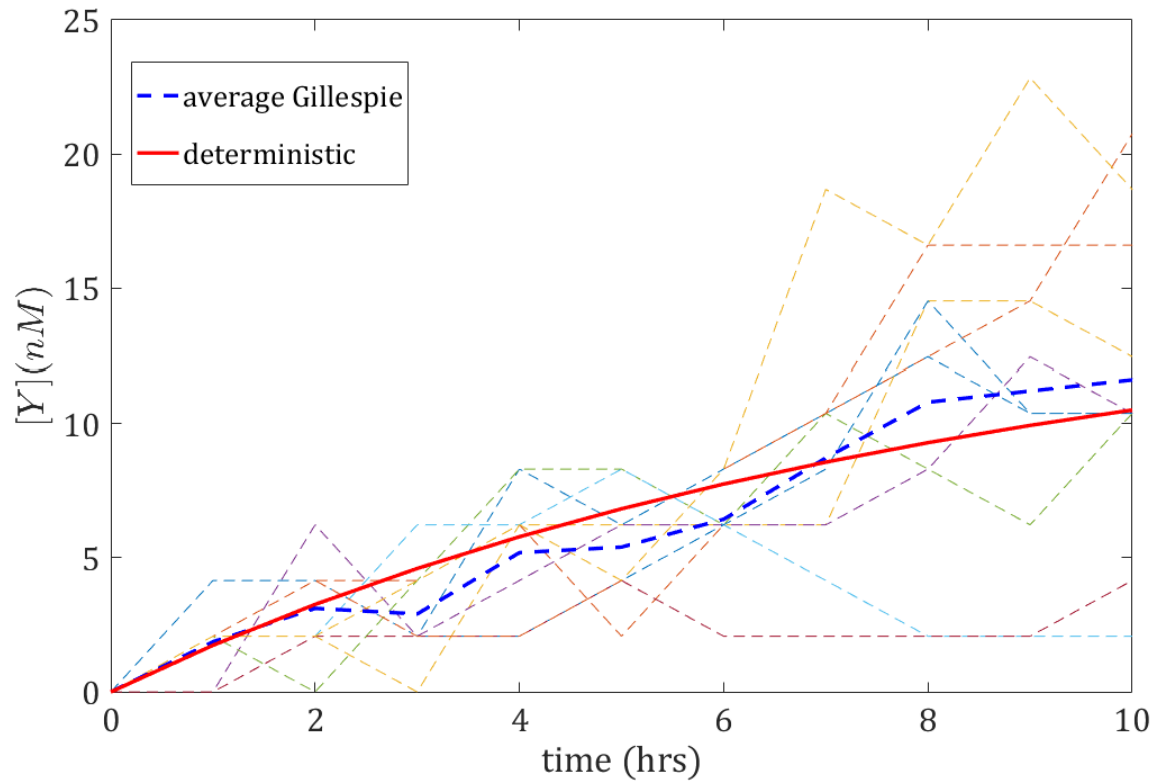
Από τη χημική κινητική: $R_i = k_1 [S_1]^2$

Συνεπώς:

$$R_i N_A V = k_1 [S_1]^2 N_A V = \left\langle \frac{X_1(X_1-1)}{2} \right\rangle c_1 \approx \frac{c_1 \langle X_1^2 \rangle}{2} \rightarrow k_1 \langle X_1 \rangle^2 \frac{1}{N_A V} = \frac{c_1 \langle X_1^2 \rangle}{2}$$

Για ντεντερμινιστικές εκφράσεις: $\langle X_1 \rangle^2 = \langle X_1^2 \rangle \rightarrow \boxed{k_1 = \frac{N_A V}{2} c_1}$

Στοχαστική Προσομοίωση – Gillespie's algorithm



Προσομοίωση του ενδοκυτταρικού δικτύου *lac operon* για συγκέντρωση ενεργοποιητή 15 μM . Στο διάγραμμα φαίνονται 10 στοχαστικές προσομοιώσεις, ο μέσος όρος τους και το αποτέλεσμα από το αντίστοιχο ντετερμινιστικό μοντέλο.