

Ατομική Διπλωματική Εργασία

**ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ
ΜΟΝΟΜΑΤΙΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΗΜGB1 ΜΕ ΑΛΓΕΒΡΕΣ
ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ**

Νάταλυ Μαρία Χειρίδου

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ



ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

Μάιος 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ

ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ

**ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ
ΜΟΝΟΜΑΤΙΩΝ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ ΗΜGB1 ΜΕ ΑΛΓΕΒΡΕΣ
ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ**

Νάταλυ Μαρία Χειρίδου

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Δρ. Άννα Φιλίππου

Η Ατομική Διπλωματική Εργασία υποβλήθηκε προς μερική εκπλήρωση των
απαιτήσεων απόκτησης του πτυχίου Πληροφορικής του Τμήματος Πληροφορικής
του Πανεπιστημίου Κύπρου

Μάιος 2012

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην κυρία Άννα Φιλίππου για την αμέριστη υποστήριξη, τις συμβουλές αλλά και την βοήθειά της καθ' όλη την διάρκεια αυτής της διπλωματικής εργασίας. Αποτέλεσε παράδειγμα προς μίμηση για μένα και μέσα από μια εξαιρετική συνεργασία και ενδιαφέρον με ενθάρρυνε σε κάθε δύσκολη στιγμή αυτής της χρονιάς, δίνοντας μου τα απαραίτητα «σπρωξίματα» την κατάλληλη στιγμή.

Την ευχαριστώ και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, το οποίο με βοήθησε να διαπιστώσω πως θα ήθελα να εμβαθύνω τις γνώσεις μου στο συγκεκριμένο πεδίο στις μετέπειτα σπουδές μου. Η γεύση από το πεδίο της Βιο-Πληροφορικής ήταν πολύ ευχάριστη για μένα.

Είναι πολύ πιθανό ότι αν δεν ήταν η κυρία Φιλίππου, τα πράγματα θα ήταν διαφορετικά.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την βιολόγο, κα Μαρία Ρούσου για την πολύτιμη βοήθεια της για την κατανόηση βιολογικών όρων, απαραίτητων για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τον συμφοιτητή μου Νικόλα Κλεάνθους με τον οποίο συνεργαστήκαμε καθόλη την διάρκεια της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η συνεργασία μας ήταν πολύ ωφέλιμη για μένα τόσο σε προσωπικό όσο και σε ακαδημαϊκό επίπεδο.

Ευχαριστώ,

Νάταλυ Χειρίδου.

Περίληψη

Ο Καρκίνος αναμφίβολα αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα και παρά την πρόοδο που σημειώνεται στην έρευνα και τη θεραπεία της εν λόγω ασθένειας, ο καρκίνος παραμένει μάστιγα για την υγεία. Κάθε νέα ανακάλυψη για θεραπεία του καρκίνου δίνει ελπίδα στους ασθενείς και κάθε προσπάθεια που γίνεται προς την κατεύθυνση αυτή αποτελεί πολύτιμο βήμα.

Η επιστήμη της Πληροφορικής έχει τις μεθόδους και τα απαιτούμενα εργαλεία για να υποστηρίξει όπως και κάθε άλλο τομέα και αυτήν την ερευνητική περιοχή. Αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο στα χέρια των ερευνητών παρέχοντας πολύτιμες υπηρεσίες και βοήθεια σε αυτούς. Η ιδέα της μοντελοποίησης βιολογικών συστημάτων με στόχο την επίτευξη *insilico* πειραμάτων φαντάζει πολύ ελκυστική, αφού κάτι τέτοιο μπορεί να ρίξει φως σε αθέατες μέχρι στιγμής πτυχές της ασθένειας συνδυάζοντας όλα τα πλεονεκτήματα που κάτι τέτοιο μπορεί να συνεπάγεται.

Οι τυπικές μέθοδοι αποτελούν ένα από τα εργαλεία της Πληροφορικής που μπορούν να εφαρμοστούν για την μοντελοποίηση βιολογικών συστημάτων και περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τις Άλγεβρες Διεργασιών, τα Δίκτυα Petri και τα Υπολογιστικά Αυτόματα. Για την μελέτη περίπτωσης της παρούσας διπλωματικής εργασίας επιλέχθηκαν οι Άλγεβρες Διεργασιών επειδή παρέχουν φορμαλισμούς που επιτρέπουν την μοντελοποίηση σημαντικών χαρακτηριστικών των βιολογικών συστημάτων όπως είναι η επικοινωνία μεταξύ υποστοιχείων και η παράλληλη λειτουργία.

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε το δίκτυο σηματοδοτικών μονοπατιών της πρωτεΐνης HMGB1 για την οποία υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι εμπλέκεται σε καρκινογένεσεις. Συγκεκριμένα, κατασκευάστηκε το μοντέλο που αντιστοιχεί σε αυτό το βιολογικό σύστημα κάνοντας χρήση του εργαλείου BetaWorkBench που υποστηρίζει την άλγεβρα διεργασιών BetaBinders. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων που στοιχειοθετούν το ότι τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στο σηματοδοτικό δίκτυο της πρωτεΐνης HMGB1 μπορούν να επηρεάσουν την μοίρα των κυττάρων,

οδηγώντας υπό κάποιες συνθήκες στον μη ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό τους αντί στην απόπτωση.

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1 Εισαγωγή 1

1.1 Στόχοι	1
1.2 Πρόλογος	2

Κεφάλαιο 2 Βιολογικό υπόβαθρο6

2.1 Γενικές πληροφορίες7	2.1.1 Η πάθηση του καρκίνου	7
	2.1.2 Ορισμός και η σημασία των πρωτεϊνών	7
	2.1.3 Ο κύκλος ζωής του κυττάρου	8
	2.1.4 Ο ορισμός και σημασία των σηματοδοτικών μονοπατιών (signaling pathways)	9
	2.1.5 Αντιγραφή DNA (DNA replication)	9
	2.1.6 Μεταγραφή DNA σε mRNA (transcriptional activity)	9
	2.1.7 Πολύ-ουβικουϊτίνωση	9
	2.1.8 Αναστολείς ενζύμων (Inhibition of proteins-enzymes)	10
2.2 Μόρια που μελετήθηκαν		10
	2.2.1 Πρωτεΐνη p53	10
	2.2.2 Κυκλίνες E και D11	
	2.2.3 Παράγοντες E2F11	
	2.2.4 Πρωτεΐνη MDM2	11
	2.2.5 Πρωτεΐνη p21	12

2.2.6 Πρωτεΐνη ARF 12

Κεφάλαιο 3 Άλγεβρες Διεργασιών	13
3.1 Άλγεβρες Διεργασιών	13
3.1.1 Απλές Άλγεβρες Διεργασιών	14
3.1.2 Σχολαστικές Άλγεβρες Διεργασιών (StochasticProcessAlgebras)	15
3.2 Παράδειγμα Αλγέβρων Διεργασιών	16
3.2.1 CCS-Calculus of Communicating Systems	16
3.2.2 π-calculus	18
3.2.3 Στοχαστική π-calculus	22
3.2.4 BetaBinders	24
 Κεφάλαιο 4 Εργαλεία κατασκευής και προσομοίωση μοντέλων σε άλγεβρες διεργασιών	 30
4.1 Το BETAWORKBENCH: Η γλώσσα BlenX	31
4.1.1 Πλεονεκτήματα του BetaWorkBench	35
4.1.2 Οι πιθανοτικές τιμές στο BetaWorkBench	37
4.1.3 Η γλώσσα του BetaWorkBench	39
4.2 VISUALSPIM42	
 Κεφάλαιο 5 Βιολογικό Σύστημα: Το σηματοδοτικό δίκτυο μονοπατιών της πρωτεΐνης HMGB1	 44
5.1 Εισαγωγή	44
5.2 Το βιολογικό σύστημα που μοντελοποιήθηκε	46
5.2.1 Περιγραφή των σηματοδοτικών μονοπατιών	47

5.2.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών	50
5.3 Μοντελοποίηση βιολογικού συστήματος στην BlenX	50
5.3.1. Λεπτομέρειες μοντελοποίησης	51
5.3.2 Κατασκευή μοντέλου	51
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 Διεξαγωγή Πειραμάτων και Αποτελέσματα	56
6.1 Πείραμα 1: Προσομοίωση του μοντέλου	58
6.2 Πείραμα 2: Μεταβολή της συγκέντρωσης των HMGB1 και AKT	61
6.3 Πείραμα 3: Μεταλλαγμένες πρωτεΐνες	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 Συμπεράσματα	72
7.1 Συμπεράσματα	72
7.1.1 Συμπεράσματα σε σχέση με τις άλγεβρες διεργασιών	72
7.1.2 Συμπεράσματα σε σχέση με τα εργαλεία	74
7.1.3 Συμπεράσματα σε σχέση με το βιολογικό σύστημα	74
7.2 Μελλοντικές επεκτάσεις	75
Βιβλιογραφία	76
Παράρτημα Α	A1
A.1 Αρχείο “model.prog”	A2
A.2 Αρχείο “model.func”	A9
A.3 Αρχείο “model.types”	A10

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1. Στόχοι	1
1.2. Πρόλογος	2

1.1. Στόχοι

Η διπλωματική αυτή εργασία αποτελεί πάντρεμα δυο επιστημονικών κλάδων: της Πληροφορικής και της Βιολογίας.

Γενικός στόχος μέσα από αυτή την δουλειά είναι η εξοικείωση με βασικές έννοιες και ιδέες της Βιολογίας και η ενσωμάτωση αυτών στο πεδίο της Πληροφορικής.

Από την σκοπιά της Πληροφορικής τέθηκε ο στόχος για εξοικείωση με τις άλγεβρες διεργασιών και η κατανόηση του πως τέτοιου είδους φορμαλισμοί με τα κατάλληλα υποστηρικτικά εργαλεία μπορούν να εφαρμοστούν στην μοντελοποίηση βιολογικών συστημάτων. Επακόλουθος στόχος είναι η μοντελοποίηση ενός βιολογικού συστήματος σε κάποιο εργαλείο προκειμένου να πραγματοποιηθούν *insilico* πειράματα, τα αποτελέσματα των οποίων θα συγκριθούν με τα αποτελέσματα ενός άλλου σχετικού άρθρου [4] καθώς και με τα πραγματικά αποτελέσματα.

Από την σκοπιά της Βιολογίας στόχος μας είναι η κατανόηση του σηματοδοτικού δικτύου της πρωτεΐνης HMGB1 (signaltransductionnetworkofHMGB1). Συγκεκριμένα, στόχος είναι η κατανόηση του πώς επηρεάζουν την μοίρα των κυττάρων (απόπτωση ή επιβίωση) οι πρωτεΐνες(και οι μεταλλαγμένες μορφές τους) που εμπλέκονται στο δίκτυο όταν αυτό είναι ενεργοποιημένο. Στοχεύουμε στην κατανόηση του ποια σηματοδοτικά μονοπάτια είναι θεμελιώδης για την περιγραφή του σηματοδοτικού δικτύου της HMGB1 και ποιοι μηχανισμοί μπορούν να δώσουν εξηγήσεις στα πρόσφατα αποτελέσματα που συνδέουν την υπερσυγκέντρωση της πρωτεΐνης HMGB1 με την μείωση στην απόπτωση και άρα στην επιβίωση των καρκινικών κυττάρων.

1.2. Πρόλογος

Τα βιολογικά συστήματα προκάλεσαν το έντονο ενδιαφέρον των επιστημόνων της Πληροφορικής, αφού πάρα πολλά από τα κύρια χαρακτηριστικά τους αντιστοιχούν στις έννοιες και τις θεμελιώδεις ιδέες των υπολογιστικών συστημάτων. Είναι εντυπωσιακό το πόσο πολύ μοιάζουν βιολογικά και υπολογιστικά συστήματα [1,3] τόσο δομικά αλλά και λειτουργικά!

Γενικά μιλώντας, τα βιολογικά συστήματα μπορούν να θεωρηθούν ως παράλληλα, πολύ πολύπλοκα και επιρρεπή σε λάθη υπολογιστικά συστήματα. Ιδού η απόδειξη:

Ο γενετικός κώδικας αποθηκεύεται σε ψηφιακή μορφή στα κύτταρα του οργανισμού με τη διαφορά της ύπαρξης τεσσάρων χαρακτήρων (G,A,T,C) για την σύνθεση αυτού αντί του δυαδικού κώδικα (binarycode) που γνωρίζουμε. Το γενετικό υλικό απαρτίζεται από πολλά γονίδια, το κάθε ένα από τα οποία εξυπηρετεί διαφορετικές λειτουργίες, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τα υπολογιστικά προγράμματα, όπου ένα σύστημα αποτελείται από ενότητες κώδικα (modules) και συναρτήσεις διαφορετικών λειτουργικοτήτων. Από τα γονίδια παράγεται το RNA, το οποίο είναι πιο προσβάσιμο από τα υπόλοιπα μέρη του κυττάρου, χαρακτηριστικό το οποίο μπορεί να παρομοιαστεί με το φόρτωμα ενός κομματιού κώδικα στην κύρια μνήμη. Οι πρωτεΐνες που παράγονται από το RNA και

εξυπηρετούν λειτουργίες καίριας σημασίας για την επιβίωση ενός οργανισμού μπορούν να αλληλεπιδράσουν με το DNA ενεργοποιώντας συγκεκριμένα γονίδια σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές. Παρόμοια λειτουργούν και κάποιες ενότητες κώδικα σε συστήματα όπου μια ενότητα μπορεί να ενεργοποιήσει την εκτέλεση άλλων ενοτήτων κώδικα. Επιπλέον, κάθε πρωτεΐνη εξυπηρετεί κάποιο σκοπό και ταξιδεύει κατά μήκος του έλικα του DNA για να διαβάσει την γενετική πληροφορία, όπως ακριβώς γίνεται κατά την σειριακή ανάγνωση των εντολών ενός προγράμματος. Τέλος, ο γενετικός κώδικας μπορεί να θεωρηθεί ως μια συλλογή υποπρογραμμάτων τα οποία ενεργοποιούνται προς εκτέλεση μετά την λήψη εξωτερικών ερεθισμάτων (κλήση) για να συμβάλουν στην ομαλή λειτουργία του συστήματος.

Από τις αρχές της δεκαετίας του 1980 οι Βιολόγοι έθεσαν τον φιλόδοξο στόχο της αποκρυπτογράφησης του ανθρώπινου γονιώματος εργαζόμενοι συλλογικά σε διεθνές επίπεδο μέσα από το HumanGenomeProject. Η ιδέα της επίτευξης της καταγραφής του γενετικού υλικού φάνταζε πολύ υποσχόμενη για την διαλεύκανση του μυστηρίου του τρόπου λειτουργίας του ανθρώπινου σώματος. Αντί αυτού, η όλη διαδικασία γέννησε ακόμη περισσότερες ερωτήσεις παρά απαντήσεις στους επιστήμονες σηματοδοτώντας την απαρχή για τον κλάδο της Συστημικής Βιολογίας (SystemsBiology).

Η Συστημική Βιολογία χωρίζεται σε δυο ευρύτερες συμπληρωματικές περιοχές με τελικό στόχο την κατανόηση αλλά και τη πρόβλεψη της συμπεριφοράς βιολογικών οργανισμών. Η μια περιοχή αφορά διεξαγωγή πειραμάτων στο εργαστήριο και συλλογή δεδομένων και αποτελεσμάτων με βάση τα οποία ανακαλύπτονται οι ιδιότητες και εκμαιεύονται οι αρχές που διέπουν την λειτουργία των βιολογικών οργανισμών. Η άλλη περιοχή αφορά την προσπάθεια μοντελοποίησης της συσσωρευμένης βιολογικής γνώσης που υπάρχει κατασκευάζοντας λεπτομερή μοντέλα. Τα μοντέλα αυτά αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο στα χέρια των επιστημόνων αφού παρέχουν σε αυτούς την δυνατότητα προσομοίωσης ενός μεγάλου εύρους πειραμάτων σε υπολογιστές πριν αποφασίσουν για το ποια από αυτά αξίζουν περεταίρω πειραματικής διερεύνησης. Έτσι, κατορθώνεται η εξοικονόμηση πόρων και επιτυγχάνεται διεξαγωγή αποδοτικής έρευνας. Τέλος, η προσομοιωμένη συμπεριφορά συστημάτων ρίχνει φως σε αθέατες μέχρι στιγμής συμπεριφορές βοηθώντας στην διαλεύκανση των μηχανισμών που καθοδηγούν την λειτουργία οργανισμών. Αποτέλεσμα

αυτού είναι η απόδοση αιτιών για ασθένειες και τυχόν ανωμαλίες στην λειτουργία των οργανισμών.

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί αυξημένο ενδιαφέρον στην κατασκευή βιολογικών μοντέλων και αυτό τεκμηριώνεται μέσα από την αυξανόμενη τάση για σχετικές επιστημονικές δημοσιεύσεις. Καθώς όμως το ενδιαφέρον αυξάνεται, υπάρχει ολοένα και μεγαλύτερη ανάγκη για μοντελοποίηση μεγαλύτερης κλίμακας βιολογικών συστημάτων που απαιτούν την κατασκευή πολύπλοκων, δύσκολα επεκτάσιμων και συντηρήσιμων μοντέλων. Στις υπάρχουσες δημοσιεύσεις τα μοντελοποιημένα βιολογικά συστήματα αφορούν εκατοντάδες αντιδράσεων μεταξύ στοιχείων και η ιδέα της μοντελοποίησης χιλιάδων αντιδράσεων φαντάζει φυσικό επακόλουθο για τα επόμενα χρόνια. Προφανώς, ένα μοντέλο τέτοιας κλίμακας δεν μπορεί να συγγραφεί ως μια ακολουθία εκατοντάδων ακόμα και χιλιάδων εντολών, όπως ακριβώς συμβαίνει και με τα συστήματα Πληροφορικής τα οποία καταγράφονται σε πολλαπλά αρχεία και διασπώνται σε λειτουργικά κομμάτια(modules). Συνεπώς, χρειάζεται η εύρεση τρόπων και μηχανισμών για την αποσύνθεση τεράστιων βιολογικών συστημάτων σε μικρότερα και πιο εύκολο-διαχειρίσιμα υποσυστήματα.

Οι ήδη υπάρχουσες τεχνικές για εξυπηρέτηση τέτοιων σκοπών στο πεδίο της Πληροφορικής, όπως είναι οι γλώσσες υψηλού επιπέδου (highlevellanguages), δεν αρκούν για την περίπτωση της συγγραφής μοντέλων βιολογικών συστημάτων αφού τα βιολογικά συστήματα διαφέρουν από τα συνήθη υπολογιστικά σε δυο θεμελιώδη σημεία. Το πρώτο αφορά το ότι οι βιολογικοί οργανισμοί είναι κυρίως παράλληλα συστήματα και το δεύτερο είναι η άμεση σύνδεση κάθε αλληλεπίδρασης(ενέργειας) στον βιολογικό οργανισμό με μια πιθανότητα εκτέλεσης της. Αυτές οι διαφορές συστήνουν την ανάγκη για εξειδικευμένους formalismούς και τεχνικές. Παρουσίαση διαφορετικών προσεγγίσεων στο θέμα αυτό γίνεται στο [2] όπου επεξηγούνται και διαφοροποιούνται οι δυο μεγάλες οικογένειες μοντέλων: τα Μαθηματικά και τα Υπολογιστικά μοντέλα και παρουσιάζονται σχετικοί formalismοί όπως είναι τα *Δίκτυα Boolean*(BooleanNetworks), τα *PetriNets*, οι *Μηχανές Αλληλεπιδρώντων Καταστάσεων*(InteractingStateMachines) και οι *Αλγεβρες Διεργασιών*(ProcessCalculi).

Στα πλαίσια της διπλωματικής αυτής εργασίας, επιλέχθηκε η μοντελοποίηση ενός βιολογικού συστήματος [4] κάνοντας χρήση Αλγεβρών Διεργασιών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν οι π -calculus[5], στοχαστική π -calculus[6] και BetaBinders[7] και το μοντέλο αρχικά αναπτύχθηκε στο εργαλείο SPiM[8] που υποστηρίζει την λογική της στοχαστικής π -calculus. Ωστόσο, λόγω κάποιων περιορισμών στις δυνατότητες του συγκεκριμένου εργαλείου, το μοντέλο κατασκευάστηκε στο περιβάλλον BetaWorkbench[9] που αφορά μοντέλα φτιαγμένα στην άλγεβρα διεργασιών BetaBinders. Ακολούθως, πραγματοποιήθηκαν πειράματα για την μελέτη της συμπεριφοράς του μοντέλου.

Η παρούσα διπλωματική δομή οργανώνεται ως εξής:

Το Κεφάλαιο 2 παρουσιάζει το βιολογικό υπόβαθρο που χρειάζεται να έχει ο αναγνώστης για να κατανοήσει το βιολογικό σύστημα και τα αποτελέσματα των πειραμάτων. Στο Κεφάλαιο 3 παρουσιάζεται η έννοια των απλών και των στοχαστικών αλγεβρών διεργασιών, καθώς επίσης γίνεται αναφορά στις άλγεβρες διεργασιών που μελετήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Το Κεφάλαιο 4 παρουσιάζει δυο εργαλεία που προσομοιώνουν μοντέλα που προέρχονται από άλγεβρες διεργασιών (BetaWorkbench και SPiM). Τα κεφάλαια που ακολουθούν αφορούν την μελέτη περίπτωσης (casestudy) που έγινε. Συγκεκριμένα, το Κεφάλαιο 5 περιγράφει το βιολογικό σύστημα που μοντελοποιήθηκε καθώς και τον τρόπο που μοντελοποιήθηκαν τα βασικότερα χαρακτηριστικά του. Το Κεφάλαιο 6 παρουσιάζει και επεξηγεί τα πειράματα που έγιναν και τέλος, στο Κεφάλαιο 7 υπάρχουν τα συμπεράσματα και οι μελλοντικές επεκτάσεις που μπορούν να γίνουν στο μοντέλο.

Κεφάλαιο 2

Βιολογικό Υπόβαθρο

2.1 Γενικές Πληροφορίες	7
2.1.1. Η πάθηση του καρκίνου	7
2.1.2. Ορισμός και σημασία πρωτεϊνών	7
2.1.3. Ο κύκλος ζωής του κυττάρου	8
2.1.4. Ο ορισμός και σημασία των σηματοδοτικών μονοπατιών (signaling pathways)	9
2.1.5. Αντιγραφή DNA (DNA replication)	9
2.1.6. Μεταγραφή DNA σε mRNA (transcriptional activity)	9
2.1.7. Πολύ-ουβικουιτίνωση	9
2.1.8. Αναστολείς ενζύμων (Inhibition of proteins-enzymes)	10
2.2. Μόρια που μελετήθηκαν	10
2.2.1. Πρωτεΐνη p53	10
2.2.2. Κυκλίνες E και D	11
2.2.3. Παράγοντας E2F	11
2.2.4. Πρωτεΐνη MDM2	11
2.2.5. Πρωτεΐνη p21	12
2.2.6. Πρωτεΐνη ARF	12

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζεται το βιολογικό υπόβαθρο για την κατανόηση εννοιών και αρχών που διέπουν τα βιολογικά συστήματα με σκοπό την εξοικείωση του αναγνώστη με τους βιολογικούς όρους που χρειάζονται για αυτή την διπλωματική εργασία [10,11].

2.1 Γενικές Πληροφορίες

2.1.1. Η πάθηση του καρκίνου

Ο Καρκίνος αναμφίβολα αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα υγείας που παρατηρούνται σήμερα και παρά την πρόοδο που σημειώνεται στην έρευνα και τη θεραπεία της εν λόγω ασθένειας, ο καρκίνος παραμένει μάστιγα για την υγεία. Φυσιολογικά, τα κύτταρα ενός οργανισμού αναπτύσσονται με έναν συγκεκριμένο ρυθμό και πολλαπλασιάζονται όταν αυτό είναι απαραίτητο για την διατήρηση της συγκέντρωσης τους στον οργανισμό αντικαθιστώντας αυτά που πεθαίνουν. Σε αρκετές όμως περιπτώσεις ο οργανισμός μπορεί να παράγει περισσότερα κύτταρα από εκείνα που πραγματικά χρειάζεται. Συγκεκριμένα, τα κύτταρα οδηγούνται σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό αντί στον φυσιολογικό θάνατο (*απόπτωση*). Η συγκέντρωση αυτών των παραπάνω κυττάρων έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία όγκων.

2.1.2. Ορισμός και σημασία των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες είναι μακρομοριακές οργανικές ενώσεις, αποτελούνται από μικρότερες ενώσεις τα αμινοξέα και έχουν ως βασικά συστατικά τον άνθρακα, υδρογόνο, οξυγόνο και άζωτο. Βρίσκονται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και είναι ύψιστης σημασίας αφού εξυπηρετούν ζωτικής σημασίας λειτουργίες γι' αυτούς διατηρώντας τους στη ζωή. Ενδεικτικά, οι πρωτεΐνες συμβάλουν: **α)** στην ανάπτυξη και αναπαραγωγή του οργανισμού, **β)** στην αποκατάσταση των κατεστραμμένων κυττάρων, **γ)** στην άμυνα του οργανισμού μέσω της παραγωγής αντισωμάτων που καταπολεμούν τις λοιμώξεις, **δ)** στην πέψη των τροφών για την εξασφάλιση ενέργειας αφού τα ένζυμα που διασπούν τις τροφές είναι κυρίως πρωτεϊνικής φύσεως, και **ε)** στη ρύθμιση του μεταβολισμού των σακχάρων (μέσω της ινσουλίνης). Τυχόν μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες μπορούν να προκαλέσουν ανωμαλίες στην λειτουργία των οργανισμών επιφέροντας δυσμενείς συνέπειες μεταξύ άλλων και ο

σχηματισμός καρκινικών όγκων. Κατά συνέπεια, η κατανόηση των αιτιών και των μηχανισμών μετάλλαξης των πρωτεϊνών έχει προκαλέσει έντονο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα.

2.1.3. Ο κύκλος ζωής του κυττάρου

Ο κύκλος ζωής ενός κυττάρου αναφέρεται στην χρονική περίοδο από τη στιγμή της δημιουργίας ενός κυττάρου, μέχρι τη στιγμή του θανάτου του όπου και σηματοδοτείται η αρχή ενός νέου κυτταρικού κύκλου. Ο κυτταρικός κύκλος πραγματοποιείται σε δύο φάσεις: **α)** την μεσόφαση, που καταλαμβάνει το 90-95% της διάρκειας της ζωής του κυττάρου και κατά την οποία το κύτταρο αναπτύσσεται, και **β)** την μίτωση, κατά την οποία το μητρικό κύτταρο διαιρείται σε δυο νέα θυγατρικά κύτταρα τα οποία είναι πανομοιότυπα του μητρικού κυττάρου.

Η μεσόφαση με τη σειρά της περιλαμβάνει τρία στάδια: G1, S και G2. Στις παραγράφους που ακολουθούν παρουσιάζονται οι βασικές πληροφορίες για καθ' ένα από τα στάδια, τις οποίες και χρειάζεται να γνωρίζει ο αναγνώστης προκειμένου να κατανοήσει το βιολογικό σύστημα που μοντελοποιήθηκε για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Το στάδιο **G1** σε ένα κύτταρο ξεκινά μόλις ολοκληρωθεί η φάση της μίτωσης του μητρικού του κυττάρου, δηλαδή από την στιγμή της ύπαρξής του. Διαρκεί μέχρι την έναρξη του σταδίου S και είναι το μεγαλύτερο σε διάρκεια στάδιο της μεσόφασης. Κατά την διάρκεια αυτού του σταδίου το κύτταρο «αποφασίζει» με βάση τις συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον, εάν θα προχωρήσει σε διπλασιασμό του δεσοξυριβοζονουκλεϊνικού οξέος (Deoxyribonucleic acid - DNA) του με σκοπό να φτάσει κάποτε στην μίτωση, ή αν θα εξέλθει του κυτταρικού κύκλου μπαίνοντας στην ήρεμη φάση G0.

Το στάδιο **S** ξεκινά εφόσον το κύτταρο αποφάσισε να προχωρήσει σε διπλασιασμό του DNA και αναφέρεται στην χρονική περίοδο διπλασιασμού του DNA στον πυρήνα.

Το στάδιο **G2** ακολουθεί μετά το στάδιο S και αποτελεί την φάση προετοιμασίας του κυττάρου για διαίρεση. Όπως και στο στάδιο G1, το κύτταρο μπορεί να εξέλθει του κυτταρικού κύκλου και να εισέλθει στη φάση G0.

Στο στάδιο **G0**, το κύτταρο βρίσκεται σε ηρεμία, δηλαδή έχει εξέλθει μόνιμα ή παροδικά από το κυτταρικό κύκλο. Με τη σειρά τους, τα κύτταρα τα οποία βρίσκονται στο στάδιο G0 ονομάζονται κύτταρα **quiescent / resting cells**.

2.1.4. Ο ορισμός και σημασία των σηματοδοτικών μονοπατιών (signaling pathways)

Με τον όρο σηματοδοτικά μονοπάτια εννοούμε μια σειρά από συγκεκριμένες ενέργειες που γίνονται σε ένα κύτταρο. Αυτές οι ενέργειες αφορούν σήματα (signals) που ανταλλάσσονται μεταξύ μορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια με μια συγκεκριμένη σειρά, όπου η λήψη ενός σήματος σηματοδοτεί την αποστολή του επόμενου. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια χρησιμεύουν στον έλεγχο και την ρύθμιση των κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι η διαίρεση/μίτωση (πολλαπλασιασμός των κυττάρων) και η απόπτωση (προγραμματισμένος/φυσικός κυτταρικός θάνατος).

2.1.5. Αντιγραφή DNA (DNA replication)

Αντιγραφή του DNA είναι ο αυτοδιπλασιασμός του DNA έτσι ώστε αυτό να μεταφερθεί από το μητρικό κύτταρο στα θυγατρικά κύτταρα. Η διαδικασία της αντιγραφής περιλαμβάνει το ξεδίπλωμα της διπλής έλικας του DNA από εξειδικευμένα ένζυμα και τη χρησιμοποίηση των ελίκων ως καλούπια για τη δημιουργία πανομοιότυπων κλώνων.

2.1.6. Μεταγραφή DNA σε mRNA (transcriptional activity)

Το DNA αδυνατεί να εξέλθει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και να μεταφραστεί σε πρωτεΐνες. Για το λόγο αυτό, εντός του πυρήνα το DNA μεταγράφεται σε πρόδρομο mRNA το οποίο αφού περάσει μια διαδικασία ωρίμανσης τότε μετατρέπεται σε αγγελιαφόρο RNA (mRNA). Ακολουθώντας το mRNA εξέρχεται του πυρήνα και μεταφράζεται σε πρωτεΐνες.

2.1.7. Πολύ-ουβικουιλίνωση

Η πολύ-ουβικουιλίνωση είναι η διαδικασία σχηματισμού μιας πολυουβικουιλινικής αλυσίδας, η οποία αποτελείται από την πρωτεΐνη ουβικουιλίνη που αρχικά συνδέεται με ομοιοπολικούς δεσμούς με αμινοξέα πρωτεϊνικών στόχων και ακολούθως προστίθενται σ' αυτή και άλλα μόρια ουβικουιλίνης [12]. Οι πολυουβικουιλινικές αλυσίδες μπορούν να προκαλέσουν μεταφορά της πρωτεΐνης στο πρωτεάσωμα για να αποικοδομηθούν γι' αυτό

το λόγο και οι συγκεκριμένη αλυσίδα είναι γνωστή και ως το «φιλί του θανάτου» των πρωτεϊνών.

2.1.8. Αναστολείς ενζύμων (Inhibition of proteins – enzymes)

Αναστολείς ενζύμων ονομάζονται οι χημικές ουσίες που μπορούν να ενωθούν με τα ένζυμα προκαλώντας σ' αυτά μόνιμη ή αντιστρεπτή αναστολή των ενζύμων. Συγκεκριμένα, οι **μόνιμοι αναστολείς** προκαλούν καταστροφή της καταλυτικής ικανότητας του ενζύμου λόγω σύνδεσης του αναστολέα με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, που ακόμη και όταν το ένζυμο δεν είναι σε θέση να επανακτήσει την καταλυτική του ικανότητα. Οι **αντιστρεπτοί αναστολείς** ενώνονται με ασθενείς δεσμούς με τα ένζυμα (στο ενεργό τους κέντρο ή σε άλλο σημείο προκαλώντας και πάλι αλλαγή στη δομή του ενεργού κέντρου) και όταν αφαιρεθούν από το ένζυμο, το ένζυμο μπορεί να ανακτήσει την καταλυτική του ικανότητα.

2.2 Μόρια που μελετήθηκαν

Σε αυτό το μέρος του κεφαλαίου παρουσιάζεται ο ρόλος και η λειτουργία κάποιων σημαντικών πρωτεϊνών και παραγόντων που περιέχονται στο βιολογικό σύστημα που μελετήθηκε και των οποίων η συμπεριφορά μελετήθηκε μέσω πειραμάτων.

2.2.1. Πρωτεΐνη p53

Είναι ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη [13] που ενεργοποιείται από σήματα (signals) που προκαλούν κυτταρικό stress (π.χ. απώλεια μηνυμάτων απαραίτητων για την επιβίωση του κυττάρου, αλλοιώσεις του DNA, ογκογονίδια).

Η ενεργοποίηση της p53 οδηγεί στην καταστολή της λειτουργίας των καρκινικών κυττάρων με αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού τους. Επίσης, μπορεί να οδηγήσει στην απόπτωση του κυττάρου εάν αυτό είναι μεταλλαγμένο.

Η πρωτεΐνη p53 συμβάλλει επίσης στην επιδιόρθωση αλλοιώσεων του γενετικού υλικού, πράγμα που επιτρέπει την επαναφορά στον κύκλο πολλαπλασιασμού του κυττάρου στο οποίο αποκαταστάθηκε αλλοίωση.

2.2.2. Κυκλίνες E και D

Οι κυκλίνες D και E (Cyclin D και Cyclin E) ανήκουν στην οικογένεια των Κυκλινών, που είναι ετεροδιμερή συμπλέγματα. Γενικά, οι κυκλίνες ρυθμίζουν την διαδικασία του κυτταρικού κύκλου και διακρίνονται σε οικογένειες (D, E, A, B), όπου κάθε οικογένεια κυκλινών έχει την ευθύνη ελέγχου διαφορετικής φάσης του κυτταρικού κύκλου [14].

Οι κυκλίνες D και E έχουν την ευθύνη ελέγχου της φάσης G1 του κύκλου ζωής των κυττάρων και η δράση τους είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης RB που είναι αναγκαία για την ολοκλήρωση των βιοχημικών διαδικασιών της φάσης G1. Στην αρχή και τέλος της φάσης G1 έχουμε αύξηση της παραγωγής και ενεργοποίηση των κυκλινών D και E αντίστοιχα.

2.2.3. Παράγοντας E2F

Οι παράγοντες E2F είναι μια οικογένεια αντιγραφικών παραγόντων οι οποίοι ελέγχουν την μετάβαση από την φάση G1 στην S στο κύκλο ζωής του κυττάρου. Συγκεκριμένα, ο E2F έχει υπό τον έλεγχό του γονίδια τα οποία καθορίζουν τις ρυθμιστικές για τον κύκλο ζωής διεργασίες του κυττάρου καθώς επίσης και γονίδια που κωδικοποιούν την μεταγραφή του DNA. Μεταξύ άλλων, ο E2F οδηγεί στην σύνθεση της Cyclin E και της cdk2 οι οποίες σχηματίζουν σύμπλοκο που ενεργοποιεί την μεταγραφή του DNA [15].

Τέλος, η πρωτεΐνη RB σχηματίζει σύμπλοκο με τον E2F, σύνδεση η οποία δεν επιτρέπει την εκδήλωση της δράσης του δεύτερου η οποία προάγει την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου μέσω κάποιων διαδικασιών [14].

2.2.4. Πρωτεΐνη MDM2

Η πρωτεΐνη MDM2 στοχεύει την P53 και την αποικοδομεί. Η ενεργοποίηση και η σταθεροποίηση της P53 σχετίζονται με την αναστολή της δράσης της MDM2. Επίσης, η πρωτεΐνη MDM2 αποτελεί παράγοντα επιβίωσης του κυττάρου όταν αυτή φωσφορυλιωθεί από την κινάση AKT, ανακόπτοντας την επαγωγή της απόπτωσης [13].

2.2.5. Πρωτεΐνηp21

Η πρωτεΐνηp21 είναι το κύριο μέλος της οικογένειας Cip/Kip των CKI. Τα CKIκαταστέλλουν τις κυκλίνες και τα σύμπλοκα αυτών, αποτρέποντας την εξέλιξη του κύκλου ζωής των κυττάρων όταν υπάρχουν αλλοιώσεις στο DNA[16].

2.2.6. Πρωτεΐνη ARF

Η πρωτεΐνηARF ελέγχει την λειτουργία της MDM2 η οποία καταστέλλει την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνηp53. Έτσι, η συσσώρευση της ARF μπλοκάρει την MDM2, επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την δράση της p53[15].

Κεφάλαιο 3

Άλγεβρες Διεργασιών

3.1 Άλγεβρες Διεργασιών	13
3.1.1. Απλές άλγεβρες διεργασιών	14
3.1.2. Στοχαστικές άλγεβρες διεργασιών	15
3.2 Παραδείγματα Άλγεβρών Διεργασιών	16
3.2.1. Calculus of Communicating Systems (CCS)	16
3.2.2. π -calculus	18
3.2.3. Στοχαστική π -calculus	22
3.2.4. Beta Binders	24

3.1. Άλγεβρες Διεργασιών

Οι άλγεβρες διεργασιών εντάσσονται κάτω από την ομπρέλα των *τυπικών μεθόδων* (formal methods). Οι *τυπικές μέθοδοι* [17] είναι εφαρμοσμένα μαθηματικά και παρέχουν ακριβείς και μαθηματικά αποδεδειγμένες μεθόδους για την υποστήριξη της ανάλυσης και της επαλήθευσης συστημάτων. Προσφέρουν τη δυνατότητα της επαλήθευσης συστημάτων

από τη φάση σχεδιασμού, αποδοτικές και αυστηρές μεθόδους ελέγχου συστημάτων με μεγαλύτερη κάλυψη και ψηλότερη εγγύηση ορθότητας και μειώνουν σημαντικά το κόστος και τον χρόνο που απαιτείται για επαλήθευση συστημάτων. Συνεπώς, αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση συστημάτων παρέχοντας την δυνατότητα για μοντελοποίηση συστημάτων και κατασκευή και έλεγχο ιδιοτήτων που πρέπει να τηρούνται από το μοντέλο. Τέλος, πέρα από τους πιο πάνω λόγους, η επιλογή για χρησιμοποίηση τέτοιων τεχνικών ενισχύθηκε και από το γεγονός ότι παρακολούθησα κατά την διάρκεια του πτυχίου μου το μάθημα *Ανάλυση και Επαλήθευση Συστημάτων* το οποίο αποσκοπούσε στην ένταξη και εξοικείωση των φοιτητών με τέτοιου είδους θέματα.

3.1.1. Απλές Άλγεβρες Διεργασιών

Θα εξηγήσουμε τι είναι οι «*άλγεβρες διεργασιών*»[18], εξηγώντας τι σημαίνει η κάθε μια από τις λέξεις «*άλγεβρα*» και «*διεργασία*».

Ο όρος «*διεργασία*» αποτελεί μια αφαιρετική έννοια του όρου νήμα (thread), και μπορεί να αποτελείται από ένα ή πολλά νήματα. Είναι δηλαδή ένα σύνολο από εντολές, οι οποίες εκτελούνται για να επιτευχθεί ένας στόχος. Διάφορες διεργασίες μπορούν να εκτελούνται ταυτόχρονα σε αυτοδύναμα περιβάλλοντα ή η ύπαρξη της μιας να αποκλείει την ύπαρξη της άλλης. Στην πρώτη περίπτωση η επικοινωνία μεταξύ διάφορων διεργασιών γίνεται εφικτή μέσω κάποιων συνδέσμων επικοινωνίας, τα γνωστά κανάλια (channel) επικοινωνίας. Μέσω αυτών των καναλιών οι διεργασίες μπορούν να στείλουν ή να λάβουν μηνύματα από άλλες διεργασίες. Έτσι, η συμπεριφορά ενός συστήματος συνθέτεται από την εκτέλεση πολλών συνεργαζόμενων ή/και ανεξάρτητων διεργασιών.

Ο όρος «*άλγεβρα*» αναφέρεται σε μια μαθηματική δομή από σύνολα τιμών και λειτουργιών που επιδρούν πάνω στις τιμές. Στην περίπτωση του όρου «*άλγεβρα διεργασιών*», η έννοια «*άλγεβρα*» αναφέρεται στην περιγραφή της συμπεριφοράς ενός συστήματος με αλγεβρικό/αξιωματικό τρόπο. Έτσι, χρησιμοποιώντας αξιώματα, μπορεί να προκύψει υπολογισμός πάνω στις διεργασίες ενός συστήματος, ο οποίος είναι πολύ χρήσιμος για την μοντελοποίηση συστημάτων.

Με βάση τις επεξηγήσεις που δόθηκαν πιο πάνω μπορούμε να καταλήξουμε ότι οι Άλγεβρες Διεργασιών στο επιστημονικό πεδίο της Πληροφορικής είναι μια οικογένεια

μαθηματικών φορμαλισμών που χρησιμεύουν στην μοντελοποίηση της συμπεριφοράς παράλληλων συστημάτων. Η μοντελοποίηση επιτυγχάνεται κάνοντας χρήση τελεστών, ονομάτων, αλγεβρικών κανόνων και αλγορίθμων και αποσκοπεί μεταξύ άλλων στο να οδηγήσει στην σύγκριση μοντελοποιημένων συστημάτων για να διαπιστωθεί εάν πρόκειται για ισοδύναμα συστήματα (δηλαδή παράγουν τα ίδια αποτελέσματα) ή να φανερώσει τις μεταξύ τους σχέσεις εάν υπάρχουν με ακριβή τρόπο.

Ο φορμαλισμός κάθε άλγεβρας διεργασιών αποτελείται από τη σύνταξη και τη σημασιολογία, τα οποία μας επιτρέπουν να μοντελοποιήσουμε τις διεργασίες που απαρτίζουν κάποιο σύστημα, τους τρόπους επικοινωνίας μεταξύ των διεργασιών και τους κανόνες με τους οποίους μπορούν να μοντελοποιηθούν οι ενέργειες που εκτελούν οι διεργασίες. Η σύνθεση όλων αυτών θα οδηγήσει στην μοντελοποίηση του συστήματος.

Απομένει τώρα η σύνδεση ανάμεσα στις άλγεβρες διεργασιών και το πώς αυτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μοντελοποιηθούν βιολογικά συστήματα. Λαμβάνοντας υπόψη την μεταφορά των βιολογικών οντοτήτων στον κόσμο της Πληροφορικής από το κεφάλαιο της Εισαγωγής καθώς και το ότι τα βιολογικά συστήματα είναι κυρίως παράλληλα συστήματα, οι άλγεβρες διεργασιών αποτελούν ένα πολύ υποσχόμενο εργαλείο για την μοντελοποίηση τέτοιων συστημάτων.

3.1.2. Στοχαστικές Άλγεβρες Διεργασιών (Stochastic Process Algebras)

Οι απλές άλγεβρες διεργασιών χρησιμοποιούνται για ποιοτική μοντελοποίηση συστημάτων, δηλαδή για την μοντελοποίηση των ποιοτικών όψεων του συστήματος. Αυτές οι όψεις χρειάζεται να μοντελοποιηθούν για παράδειγμα για τον έλεγχο ύπαρξης αδιεξόδων (deadlocks) και τον έλεγχο ισοδυναμίας μεταξύ συστημάτων. Δηλαδή, αυτού του τύπου άλγεβρες διεργασιών (όπως η CCS και η π -calculus), δεν ασχολούνται με τα ποσοτικά χαρακτηριστικά ενός συστήματος, τα οποία θα καθορίσουν και την εξελικτική λειτουργία του, αλλά μόνο με τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά. Έτσι, η έννοια του μη ντετερμινισμού (non-determinism) είναι αναπόφευκτη όταν μοντελοποιούμε συστήματα με απλές άλγεβρες διεργασιών, εννοώντας ότι σε κάθε κατάσταση που βρίσκεται το σύστημα πρέπει να διευκρινιστούν όλες οι πιθανές ενέργειες που είναι δυνατόν να γίνουν ως επόμενο βήμα

στην εκτέλεση του. Όλες αυτές οι πιθανές ενέργειες είναι ισοπίθανες και δεν μπορούμε να αποφανθούμε για το ποια έχει την μεγαλύτερη πιθανότητα να εκτελεστεί.

Σε αυτό το σημείο προκύπτει η ανάγκη για την εύρεση τρόπων, οι οποίοι θα φανερώσουν ποιες ενέργειες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εκτελεστούν στο επόμενο βήμα εκτέλεσης και αυτό θα γίνει σύμφωνα με τα ποσοτικά χαρακτηριστικά του συστήματος. Μιλώντας για βιολογικά συστήματα, τέτοια ποσοτικά χαρακτηριστικά μπορεί να είναι ο αριθμός συγκεκριμένου είδους μορίων στο οργανισμό, ο οποίος θα δώσει πλεονέκτημα σε μια συγκεκριμένη ενέργεια για να εκτελεστεί έναντι άλλων πιθανών ενεργειών ή ο συσχετισμός μιας ενέργειας με μια πιθανοτική τιμή (*rate*) που να επηρεάζει την πιθανότητα επιλογής της προς εκτέλεση. Με άλλα λόγια, η έννοια της *στοχαστικότητας* αφορά την ένταξη ποσοτικοποιημένων πληροφοριών στις προδιαγραφές ενός συστήματος που αφορούν την ταχύτητα ή την πιθανότητα με την οποία συμβαίνουν κάποιες ενέργειες.

Συνοψίζοντας τα πιο πάνω, κάθε σύστημα εκτός από ποιοτικά χαρακτηριστικά έχει και ποσοτικά χαρακτηριστικά. Αυτά τα χαρακτηριστικά χρειάζεται να μοντελοποιηθούν μεταξύ άλλων και για την αξιολόγηση της απόδοσης του συστήματος. Γι'αυτό υπήρξε η ανάγκη για εύρεση τρόπων ενσωμάτωσης τους στους φορμαλισμούς των αλγεβρών διεργασιών, με αποτέλεσμα την επινόηση των *πιθανοτικών αλγεβρών διεργασιών* (*stochastic process algebras*).

Θα ακολουθήσει περιγραφή των αλγεβρών διεργασιών που μελέτησα στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας, καθώς και σύγκριση μεταξύ τους. Με σειρά θα παρουσιαστούν, η *άλγεβρα των συστημάτων επικοινωνίας* (*Calculus of Communicating Systems -CCS*), η *π-calculus* και η εξελιγμένη μορφή της *στοχαστική π-calculus* και η *BetaBinders*.

3.2. Παραδείγματα Αλγεβρών Διεργασιών

3.2.1. CCS – Calculus of Communicating Systems

Η *άλγεβρα διεργασιών CCS – Calculus of Communicating Systems* [19] επινοήθηκε από τον Robin Milner την χρονική περίοδο 1973 – 1980.

Στην CCS οι διεργασίες μοντελοποιούνται συνθέτοντας ατομικές ενέργειες με τη χρήση τελεστών σύνθεσης διεργασιών. Αυτές οι ατομικές ενέργειες μπορεί να είναι ενέργειες εισόδου, ενέργειες εξόδου ή εσωτερικές ενέργειες. Έτσι, για να ορίσουμε την σύνταξη της CCS υποθέτουμε τα εξής σύνολα:

- L είναι το σύνολο των ενεργειών εισόδου
- $\bar{L}$ είναι το σύνολο των ενεργειών εξόδου
- $L \cup \bar{L}$ είναι το σύνολο των ενεργειών εισόδου και εξόδου
- $Act = L \cup \bar{L} \cup \tau$ είναι το σύνολο όλων των ενεργειών (η ενέργεια τ είναι εσωτερική ενέργεια στην διεργασία και δεν μπορεί να παρατηρηθεί από το περιβάλλον)

Πιο κάτω παραθέτουμε την σύνταξη στην CCS:

$$\begin{array}{ll}
 E = & 0 \quad \text{τερματισμός} \\
 & | \alpha.E \quad \text{διαδοχή} \quad \alpha \in Act \\
 & | E_1 + E_2 \quad \text{επιλογή} \\
 & | E_1 | E_2 \quad \text{ταυτοχρονισμός} \\
 & | E \setminus l \quad \text{περιορισμός} \quad l \subseteq L \\
 & | E[f] \quad \text{μετονομασία} \quad f: L \rightarrow L \\
 & | C \quad \text{κλήση} \quad C \subset K
 \end{array}$$

K : σύνολο απο ονόματα διεργασιών

Η έννοια του *τερματισμού* είναι ότι η διεργασία E δεν μπορεί να εκτελέσει περαιτέρω ενέργειες. Άρα, με αυτόν τον τρόπο μοντελοποιούμε διεργασίες που δεν ανταποκρίνονται πλέον ή έχουν έρθει σε αδιέξοδο. Η έννοια της *διαδοχής* είναι ότι η διεργασία θα εκτελέσει την ενέργεια α και στην συνέχεια θα συμπεριφέρεται σαν διεργασία E . Η *επιλογή* μοντελοποιεί την περίπτωση όπου μια διεργασία μπορεί να εκτελέσει μια εκ των δύο υποδιεργασιών E_1 ή E_2 . Η έννοια του *ταυτοχρονισμού ή παράλληλης σύνθεσης* είναι ότι οι υποδιεργασίες E_1 ή E_2 μπορούν να εκτελεστούν ταυτόχρονα. Αυτές οι δύο διεργασίες

μπορούν να εκτελούνται ανεξάρτητα ή να επικοινωνούν μέσω καναλιών τα οποία τις συνδέουν. Σε αυτό το σημείο έρχεται και η ανάγκη για την έννοια του *περιορισμού*. Τα κανάλια τα οποία είναι υπό περιορισμό στην E , χρησιμοποιούνται αποκλειστικά εντός της E , και καμία άλλη διεργασία από το εξωτερικό περιβάλλον της E δεν έχει πρόσβαση σε αυτά. Τέλος, η *μετονομασία* επιτρέπει την μετονομασία των καναλιών μιας διεργασίας.

Για την CCS υπάρχει διαθέσιμος `ocompilerProcessAlgebraCompiler` (PAC), ο οποίος είναι ένα εργαλείο που διευκολύνει την μοντελοποίηση με άλγεβρες που είναι συμβατές με το εργαλείο επαλήθευσης μοντέλων `ConcurrencyWorkbenchfortheNewCentury` (CWB-NC). Το CWB-NC αναλύει την συμπεριφορά ενός συστήματος με μεθόδους για εύρεση ισοδυναμίας, μοντελοέλεγχο, προσομοίωση κλπ. . Το εργαλείο PAC, δέχεται σαν είσοδο μία υψηλού επιπέδου περιγραφή του συστήματος με τη σύνταξη και τη σημασιολογία μιας άλγεβρας διεργασιών όπως η CCS και παράγει ένα αρχείο με `StandardMLsourcecode` , το οποίο θα δοθεί σαν είσοδος στο CWB-NC για ανάλυση. (<http://www.reactive-systems.com/pac/>).

3.2.2. π -calculus

Η άλγεβρα διεργασιών π -calculus [5] είναι ένας μαθηματικός τρόπος για να μοντελοποιήσουμε διεργασίες οι οποίες μεταβάλλουν τον τρόπο επικοινωνίας τους με άλλες διεργασίες που βρίσκονται στο εξωτερικό τους περιβάλλον, καθώς εκτελούνται. Η βασική ιδέα που την διέπει, είναι η ικανότητα να μοντελοποιεί την επικοινωνία μεταξύ διεργασιών, κατά την οποία μία διεργασία στέλνει ένα κανάλι επικοινωνίας σε κάποια άλλη, ούτως ώστε η παραλήπτρια διεργασία να μπορεί να χρησιμοποιήσει αυτό το κανάλι για να επικοινωνήσει με την αποστολέα-διεργασία ή ακόμη, για να στείλει το κανάλι αυτό σε κάποια τρίτη διεργασία. Όπως διαφαίνεται, ο ρόλος ενός καναλιού στην π -calculus είναι διπλός. Από την μια ένα κανάλι επικοινωνίας λειτουργεί ως αντικείμενο που ανταλλάσσεται μεταξύ των διεργασιών, και από την άλλη αποτελεί διάδρομο επικοινωνίας μεταξύ διεργασιών. Αυτή η «ικανότητα» στην π -calculus αποτελεί και το κύριο πλεονέκτημα της έναντι των άλλων αλγεβρών διεργασιών.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αποσαφηνιστεί το γιατί η ικανότητα που αναφέραμε καθιστά την π -calculus καλύτερη από τις συνηθισμένες άλγεβρες διεργασιών που επιτρέπουν

πέρασμα τιμών (*value-passing process algebras*). Θα μπορούσαμε να πούμε ότι η π -calculus είναι μια ειδική περίπτωση αυτών των αλγεβρών διεργασιών, όπου οι τιμές που περνούν σαν παράμετροι είναι τα κανάλια επικοινωνίας. Μάλιστα κάποιος θα μπορούσε να ισχυριστεί ότι η π -calculus υστερεί σε σχέση με άλλες, σκεφτόμενος ότι υπάρχει μόνο ένα είδος αντικειμένων που ανταλλάσσεται (τα κανάλια επικοινωνίας) και στο οποίο δεν υπάρχει καμία εσωτερική δομή (πρόκειται για απλές ονομασίες). Όμως, αυτή ακριβώς η ιδιότητα της είναι που την καθιστά ξεχωριστή, αφού επιτρέπει την μετακίνηση τοπικών εμβελειών (*local scopes*). Για παράδειγμα, αν μόνο δύο διεργασίες A και B έχουν δικαίωμα πρόσβασης σε ένα κανάλι επικοινωνίας c , καμία άλλη διεργασία δεν μπορεί να χρησιμοποιήσει το κανάλι αυτό. Άρα, η εμβέλεια του καναλιού αυτού είναι μεταξύ των διεργασιών A και B . Εφόσον στην π -calculus, ένα κανάλι μπορεί να μεταφερθεί, το κανάλι c μπορεί να σταλεί σε μία τρίτη διεργασία C από μία εκ των δύο διεργασιών A και B . Έτσι, η εμβέλεια του καναλιού αυτού μετατοπίζεται (μαζί με το κανάλι) μεταξύ της διεργασίας C και αυτής που της έστειλε το κανάλι c .

Η ιδιότητα της π -calculus που περιγράφηκε πιο πάνω, την καθιστά κατάλληλη για την μοντελοποίηση συστημάτων, τα οποία χρησιμοποιούν πηγές μεταβαλλόμενες στον χρόνο. Η δύναμη εκφραστικότητας της ενισχύεται από την ικανότητά της να μοντελοποιεί τις έννοιες της *προσβασιμότητας* (*accessibility*) και των *πηγών* (*resources*), αφού αποτελούν βασικές έννοιες στην θεωρία των παράλληλων συστημάτων. Επιπλέον, πλεονέκτημα για την π -calculus αποτελεί το γεγονός της ύπαρξης της γλώσσας προγραμματισμού *PICT* (Pierce & Turner, 1995), η οποία κατασκευάστηκε βασισμένη σε αυτήν.

Πιο κάτω παρατίθεται η σύνταξη της π -calculus.

Prefixes	$\alpha ::= \bar{a}x$ $a(x)$ τ	Output Input Silent
Agents	$P ::= 0$ $\alpha.P$ $P + P$ $P \mid P$ $\text{if } x = y \text{ then } P$ $\text{if } x \neq y \text{ then } P$ $(\nu x)P$ $A(y_1, \dots, y_n)$	Nil Prefix Sum Parallel Match Mismatch Restriction Identifier
Definitions	$A(x_1, \dots, x_n) \stackrel{\text{def}}{=} P \quad (\text{where } i \neq j \Rightarrow x_i \neq x_j)$	

Για την μοντελοποίηση οποιουδήποτε συστήματος με την π -calculus χρειάζεται να υποθέτουμε την ύπαρξη ενός μη πεπερασμένου συνόλου ονομάτων $N = \{a, b, \dots, z\}$, τα οποία λειτουργούν ως διακριτικά για τα κανάλια επικοινωνίας, τις θύρες για λήψη αντικειμένων από τις διεργασίες, μεταβλητές κλπ. και ένα σύνολο $A = \{A, B, C, \dots, P, \dots\}$ το οποίο αντιστοιχεί στις διεργασίες του συστήματος.

Από τον πίνακα πιο πάνω παρατηρούμε ότι μια διεργασία ορίζεται από προθέματα (prefixes) και πράκτορες (agents).

Ένα πρόθεμα μπορεί να είναι πρόθεμα εισόδου, πρόθεμα εξόδου ή εσωτερική ενέργεια τ . Ένα πρόθεμα εισόδου (InputPrefix) $a(x).P$ σημαίνει ότι η διεργασία μπορεί να λάβει ένα αντικείμενο μέσω του καναλιού a και να το τοποθετήσει στο x , το οποίο λειτουργεί σαν μεταβλητή που πρόκειται να αρχικοποιηθεί. Ακολούθως, κάθε παρουσία του x στον ορισμό θα αντικατασταθεί από το αντικείμενο που λήφθηκε και η διεργασία θα συνεχίσει να εκτελείται ως η διεργασία P . Ένα πρόθεμα εξόδου (OutputPrefix) $\bar{a}x.P$ σημαίνει ότι η διεργασία θα στείλει μέσω του καναλιού a ένα αντικείμενο x και ακολούθως θα συνεχίσει να εκτελείται ως η διεργασία P . Τέλος, μια εσωτερική ενέργεια (SilentPrefix) τ δηλώνει ότι η διεργασία θα εξελιχτεί στη διεργασία P χωρίς να επικοινωνήσει με το περιβάλλον της, εκτελώντας κάποια εσωτερική ενέργεια η οποία είναι αδύνατο να παρατηρηθεί από άλλες εξωτερικές διεργασίες.

Ένας πράκτορας μπορεί να οριστεί χρησιμοποιώντας τις έννοιες της *Επιλογής* (*Sum*), της *Παράλληλης Λειτουργίας* (*ParallelComposition*), της *Ταύτισης* (*Match*), της *Μη-Ταύτισης* (*Mismatch*), του *Περιορισμού* (*Restriction*) και του *Αναγνωριστικού* (*Identifier*). Η *Επιλογή* δηλώνεται με χρήση του τελεστή $+$, ο οποίος αναπαριστά την δυνατότητα επιλογής ανάμεσα σε διεργασίες/πράκτορες στις οποίες δύναται να εξελιχθεί η παρούσα διεργασία. Η *Παράλληλη Λειτουργία* εφαρμόζεται με την χρήση του τελεστή $|$ και υποδηλώνει ότι η παρούσα διεργασία μπορεί να λειτουργεί εκτελώντας ταυτόχρονα περισσότερες από μια υποδιεργασίες/πράκτορες. Αυτές οι υποδιεργασίες μπορεί να εκτελούνται ανεξάρτητα η μια από την άλλη, ή να επικοινωνούν ανταλλάσσοντας μηνύματα μέσω ενός καναλιού. Η *Ταύτιση* χρησιμοποιείται γράφοντας $\text{if } (x = y) \text{ then } P$ και δηλώνει ότι η παρούσα διεργασία θα εξελιχθεί στην διεργασία P μόνο εάν τα ονόματα x και y ταυτίζονται. Σε αντίθετη περίπτωση, δεν θα εκτελέσει καμία ενέργεια. Σε αντίθεση με την *Ταύτιση*, η *Μη-Ταύτιση* $\text{if } (x \neq y) \text{ then } P$ δηλώνει ακριβώς το αντίθετο. Δηλαδή, ότι η τρέχουσα διεργασία θα εξελιχθεί στον πράκτορα P μόνο εάν τα ονόματα x και y δεν είναι τα ίδια. Ο *Περιορισμός* $(\nu x)P$ δηλώνει ότι η διεργασία λειτουργεί ως η διεργασία P , έχοντας σε αποκλειστική χρήση τον πόρο (κανάλι) x . Αυτό το κανάλι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μέσα στις υποδιεργασίες οι οποίες πιθανόν να συνθέτουν την P και δεν είναι προσβάσιμο από καμία άλλη διεργασία στο εξωτερικό περιβάλλον της διεργασία μας, ούτε μπορεί να χρησιμοποιηθεί από την διεργασία μας για να επικοινωνήσει με άλλες διεργασίες από το εξωτερικό της περιβάλλον. Τέλος, το *Αναγνωριστικό* $A(y_1, \dots, y_n)$, έχει ένα ορισμό $A(x_1, \dots, x_n) \stackrel{\text{def}}{=} P$, στον οποίο κάθε x_i είναι διαφορετικό. Η διεργασία μπορεί να συμπεριφερθεί όπως την διεργασία P εάν αντικαταστήσουμε κάθε y_i με το αντίστοιχο x_i . Να σημειώσουμε ότι μια διεργασία μπορεί να είναι και ο *μηδενικός πράκτορας* 0 , όπου σε αυτή την περίπτωση δεν εκτελεί καμία ενέργεια.

CCS vs. π -calculus

Στην CCS ένα κανάλι επικοινωνίας μεταξύ δύο διεργασιών δηλώνεται τοπικά μέσα στις διεργασίες, και παραμένει αποκλειστικός πόρος για τις συγκεκριμένες διεργασίες καθ' όλη την λειτουργία του συστήματος. Έτσι, γράφουμε $(P \mid Q)_a$ εννοώντας ότι οι διεργασίες P και Q επικοινωνούν μεταξύ τους μέσω του πόρου-καναλιού a , και αυτό είναι στην αποκλειστική διάθεση αυτών των δύο διεργασιών καθ' όλη την λειτουργία του

συστήματος. Άρα, με αυτό τον τρόπο επιβάλλεται περιορισμός στις άλλες διεργασίες του συστήματος όσον αφορά την πρόσβασή τους στο κανάλι a , το οποίο έχει διακριτό όνομα στο σύστημα.

Στην π -calculus αυτός ο περιορισμός δηλώνεται γράφοντας $(\nu a) (P \mid Q)$ και σημαίνει ότι στο κανάλι a έχω πρόσβαση μόνο οι διεργασίες P και Q . Η διαφορά μεταξύ των δύο αλγεβρών διεργασιών είναι το ότι στην π -calculus το κανάλι a είναι μεν ένα αντικείμενο υπό περιορισμό αλλά ταυτόχρονα είναι και ένα μετακινήσιμο αντικείμενο. Έτσι, μπορεί να σταλεί σε μια άλλη διεργασία του συστήματος από μια εκ των P και Q διεργασιών, για να χρησιμοποιηθεί από αυτήν. Με άλλα λόγια, ο περιορισμός στην εμβέλεια του καναλιού a μπορεί να μεταβληθεί. Άρα, επιτρέπεται η μοντελοποίηση της μεταφερσιμότητας στις εργασίες (processmobility), δηλ, η μοντελοποίηση των αλλαγών στην δομή των διεργασιών.

Μια άλλη διαφορά μεταξύ αυτών των δύο αλγεβρών διεργασιών είναι ο *συντελεστής μετονομασίας* (relabelingoperator). Στην CCS αυτή η έννοια γράφεται ως $[a/b]$ και σημαίνει ότι η ύπαρξη του διακριτικού a αντικαθιστάται από το σύμβολο b . Έτσι, εάν στην διεργασία B θέλουμε να αντικαταστήσουμε μια θύρα εισόδου i με την i' γράφουμε $B[i/i']$. Στην π -calculus δεν υπάρχει αυτός ο συντελεστής. Ωστόσο, όλο αυτό μπορεί να μοντελοποιηθεί με την έννοια του *αναγνωριστικού* που είδαμε πιο πάνω, γράφοντας $B(i')$ αντί $B(i)$.

3.2.3. Στοχαστική π -calculus

Η Στοχαστική π -calculus [6] έρχεται να ενισχύσει τις ικανότητες της απλής π -calculus, εισάγοντας την έννοια των *πιθανοτήτων* σε συνδυασμό με την *εκθετική κατανομή* (exponentialdistribution) στην μοντελοποίηση συστημάτων. Γι' αυτό το λόγο εντάσσεται στην οικογένεια των *ProbabilisticProcessAlgebras*, οι οποίες αποβάλλουν την έννοια του μη ντετερμινισμού (non-determinism) δίνοντας πλεονέκτημα στις ενέργειες που έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εκτελεστούν σύμφωνα με τη τρέχουσα κατάσταση του συστήματος. Το πώς ακριβώς γίνεται αυτό περιγράφεται πιο κάτω.

Η σύνταξή της είναι παρόμοια με την π -calculus, με μικρές αλλαγές στα προθέματα των διεργασιών, αλλά ταυτόχρονα με σημαντική σημασιολογία γύρω από αυτές τις αλλαγές.

Συγκεκριμένα, κάθε ενέργεια ενισχύεται με μία *πιθανοτική τιμή* r (*rate*), η οποία αντιπροσωπεύει την τιμή της εκθετικής κατανομής με παράμετρο r . Έτσι, η σύνταξη $\pi.P$ για μια διεργασία που εκτελεί την ενέργεια π και ακολούθως συνεχίζει να εκτελείται ως P , τώρα γίνεται $(\pi, r).P$. Αυτή η νέα τιμή που περιγράφουμε αφορά την καθυστέρηση Δt η οποία απαιτείται για να ολοκληρωθεί η ενέργεια. Λαμβάνοντας υπόψη ότι μια ενέργεια για να εκτελεστεί χρειάζεται να χρησιμοποιήσει κάποιο πόρο του συστήματος (π.χ. κανάλια επικοινωνίας), αυτή η καθυστέρηση αντιπροσωπεύει το χρονικό διάστημα για το οποίο η ενέργεια χρησιμοποιεί αυτόν τον πόρο. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι η εκτέλεση μιας ενέργειας δεν εξαρτάται από το χρονικό διάστημα που πέρασε από την τελευταία εμφάνιση κάποιας άλλης ενέργειας. Αυτό προκύπτει από την ιδιότητα της εκθετικής κατανομής να μην απαιτεί «μνήμη» (*memoryless property*).

Με βάση τα πιο πάνω, η στοχαστική π -calculus δίνει ελαφρώς διαφορετική σημασιολογία στις έννοιες της *Επιλογής* και της *Παράλληλης Σύνθεσης* διαφοροποιώντας τις ως εξής:

- Στην *Επιλογή* μεταξύ διεργασιών προς εκτέλεση $P + Q$, οι διεργασίες ανταγωνίζονται ως προς το ποια θα χρησιμοποιήσει ένα συγκεκριμένο πόρο του συστήματος. Ως εκ τούτου, πολλές διεργασίες προσπαθούν να επικρατήσουν, ωστόσο η γρηγορότερη είναι αυτή που στο τέλος θα τα καταφέρει. Αυτή που θα επικρατήσει μια φορά δεν σημαίνει ότι θα επικρατεί πάντοτε δεδομένου ότι οι τιμές για την διάρκεια ολοκλήρωσής τους δίνονται με τυχαίο τρόπο. Τέλος, η ερμηνεία παραμένει ίδια όσον αφορά το ότι τελικά το σύστημα θα συμπεριφερθεί είτε σαν διεργασία P είτε σαν διεργασία Q . Να σημειωθεί ότι στις συνηθισμένες άλγεβρες διεργασιών η *Επιλογή* διέπεται από μη ντετερμινισμό, ενώ εδώ υπάρχει η έννοια της πιθανότητας.
- Στην *Παράλληλη Σύνθεση* διεργασιών προς εκτέλεση $P|Q$, η σημασιολογία παραμένει η ίδια. Οι διεργασίες μπορούν να εκτελεστούν ταυτόχρονα και ανεξάρτητα η μια από την άλλη, ή να εκτελεστούν πραγματοποιώντας μεταξύ τους επικοινωνία. Στη στοχαστική π -calculus, η επικοινωνία αυτή επιτυγχάνεται με πιθανότητα ίση με την μικρότερη πιθανότητα μεταξύ των P και Q .

Σε αυτό το σημείο θα κάνουμε μια αναφορά στον τρόπο διεξαγωγής των πιθανοτήτων για εκτέλεση κάποιας διεργασίας, αλλά και για την πιθανότητα που κατανέμεται σε κάθε ενέργεια μιας διεργασίας (για τα πιο κάτω υποθέτουμε ότι υπάρχει μόνο μια εμφάνιση της διεργασίας στο σύστημα). Τα πιο κάτω στοιχεία υπάρχουν αναλυτικά και ολοκληρωμένα στο [6]:

- Μια διεργασία P έχει πιθανότητα να εκτελεστεί : $r(P) = \sum_{P \xrightarrow{(a_j, r_j)} P_j \in Ts(P)} r_j$.

Δηλαδή η πιθανότητα για να εκτελεστεί μια διεργασία ισούται με το άθροισμα των πιθανοτήτων όλων των ενεργειών της που μπορούν να εκτελεστούν την δεδομένη χρονική στιγμή. Ο συμβολισμός $Ts(P)$ αναπαριστά το σύνολο όλων των πιθανών μεταβάσεων-ενεργειών της διεργασίας P που μπορούν να εκτελεστούν.

- Μια ενέργεια i μιας διεργασίας P : $P \xrightarrow{(a_i, r_i)} P_i \in Ts(P)$ έχει πιθανότητα να συμβεί ίση με $\frac{r_i}{r(P)}$. Για παράδειγμα, η πιθανότητα να συμβεί η ενέργεια a στην περίπτωση $(a, 3) + (b, 4)$ είναι $\frac{3}{7}$.
- Μια ενέργεια a μπορεί να εμφανίζεται περισσότερες από μια φορές ως επιλογή για το επόμενο βήμα εκτέλεσης μιας διεργασίας P . Έτσι, η πιθανότητα $r_a(P)$ να συμβεί η ενέργεια αυτή ισούται με το άθροισμα των πιθανοτήτων όλων των εμφανίσεων της. Φορμαλιστικά αυτό παριστάνεται ως εξής: $r_a(P) = \sum_{P \xrightarrow{a, r_j} P_j \in Ts(P)} r_j$ και η πιθανότητα αυτή λέγεται *apparent rate*. Για παράδειγμα, στην περίπτωση $(a, 3) + (a, 4)$ η πιθανότητα να συμβεί η ενέργεια a είναι 7. Στην περίπτωση εσωτερικής ενέργειας μεταξύ δύο διεργασιών P και Q , η πιθανότητα να συμβεί αυτή η ενέργεια ισούται με το $\min(r_a(P), r_{\bar{a}}(Q))$.

3.2.4. Beta Binders

Η άλγεβρα διεργασιών *BetaBinders*[7,20] επινοήθηκε το 2005 από τους Corrado Priami και Paola Quaglia στο Πανεπιστήμιο του Τρέντο στην Ιταλία και κατασκευάστηκε με σκοπό την διευκόλυνση της μοντελοποίησης βιολογικών συστημάτων. Συνεπώς, η συγκεκριμένη άλγεβρα διεργασιών είναι ιδανική για μοντελοποίηση βιολογικών οντοτήτων αφού παρέχει τρόπους μοντελοποίησης των λειτουργιών που δυνατόν να εκτελούνται σε τέτοιου είδους

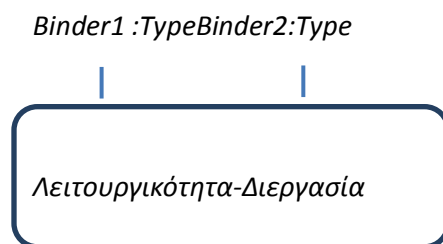
συστήματα. Τέτοιες λειτουργίες μπορεί να είναι η φωσφορυλίωση και η ενεργοποίηση πρωτεϊνών.

Πρόκειται για μια άλγεβρα διεργασιών ισχυρά συνδεδεμένη και εμπνευσμένη από την π -calculus[5], γι' αυτό και χρησιμοποιεί την *επικοινωνία* ως το κυρίαρχο στοιχείο αλληλεπίδρασης μεταξύ συντρεχόντων (παράλληλων) διεργασιών. Το βασικότερο στοιχείο της *επικοινωνίας* μεταξύ διεργασιών είναι ο *συγχρονισμός* σε κανάλια τα οποία εκτελούν συμπληρωματικές ενέργειες εισόδου και εξόδου.

Επιπλέον, η BetaBinders παρέχει μηχανισμούς μοντελοποίησης ενσωματωμένων οντοτήτων σε άλλες οντότητες υποστηρίζοντας μάλιστα την λειτουργικότητα τους. Για παράδειγμα, υπάρχει η δυνατότητα να μοντελοποιήσουμε την συμπεριφορά του πυρήνα ενός κυττάρου καθώς αυτός βρίσκεται ενσωματωμένος μέσα στο κύτταρο. Η συμπεριφορά αυτή δυνατόν να αφορά την αλληλεπίδραση του πυρήνα με άλλες εσωτερικές οντότητες του κυττάρου ή ακόμα και την εκτέλεση κάποιων εσωτερικών ενεργειών στον πυρήνα.

Οι ανεπτυγμένες δυνατότητες που προσφέρει η BetaBinders οφείλονται σε μια εξειδικευμένη κλάση *συνδετών(binders)* οι οποίοι χρησιμοποιούνται για να εσωκλείσουν οποιαδήποτε διεργασία προέρχεται από την π -calculus μέσα στα λεγόμενα *κουτιά (boxes)*, τα οποία μάλιστα έχουν δυνατότητες αλληλεπίδρασης. Συγκεκριμένα, τα *boxes* αυτά αναπαριστούνται ως πλαίσια βιολογικών οντοτήτων όπου στο εσωτερικό τους υπάρχει η λειτουργικότητα τους(εκφρασμένη παρόμοια με την άλγεβρα διεργασιών π -calculus) ενώ στην επιφάνια τους φέρουν ειδικές «θέσεις» που αντιπροσωπεύουν αυτό που αναφέρθηκε πιο πάνω ως *binders*. Οι *binders* αυτοί χαρακτηρίζονται από κάποιον *τύπο* και ανάλογα με αυτόν μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλους *binders* άλλων *boxes*, εφόσον αυτό έχει οριστεί.

Σχήμα 3.2.4.1: Γραφική αναπαράσταση ενός κουτιού



Το *κουτί(box)* που απεικονίζεται στο σχήμα 3.2.4.1 αφαιρετικά παρουσιάζει ένα *κουτί* που ανήκει σε μια πρωτεΐνη. Η πρωτεΐνη στην οποία ανήκει αυτό το *κουτί* μπορεί να αλληλεπιδράσει με πρωτεΐνες που βρίσκονται στο εξωτερικό περιβάλλον της (άλλα *κουτιά*) μέσω των *Binder1* και *Binder2*, φτάνει αυτό να έχει οριστεί στις προδιαγραφές του μοντέλου. Η *λειτουργικότητα* του *κουτιού*, με άλλα λόγια η εξελικτική πορεία και οι δυνατότητες συμπεριφοράς της πρωτεΐνης είναι ορισμένες εντός του πλαισίου του *κουτιού*, εκφρασμένες με *μακρό-εντολές (macro-operations)*. Αυτές οι εντολές αφορούν αλληλεπίδραση μεταξύ συστατικών στοιχείων τα οποία είναι δυνατόν να βρίσκονται είτε στο εσωτερικό είτε στο εξωτερικό περιβάλλον του *κουτιού* και έχουν σαν αποτέλεσμα την απόδοση της συμπεριφοράς βιολογικών οντοτήτων. Οι *μακρο-εντολές* εντάσσονται σε δυο ευρύτερα σύνολα εντολών. Το ένα αφορά την *ενδο-επικοινωνία (intra-communication)* και το άλλο την *επικοινωνία μεταξύ οντοτήτων (inter-communication)*. Παραδείγματα *μακρο-εντολών* είναι η *δυναμική προσθήκη (expose)* ενός *συνδέτη* σε ένα *κουτί*, το *κρύψιμο (hide)* και *αποκάλυψη (unhide)* ενός *binder*, η *ένωση (join)* δυο διακριτών *κουτιών* σε ένα νέο *κουτί* και η *διάσπαση (split)* ενός *κουτιού* σε άλλα δυο νέα *κουτιά*.

Στα επόμενα υποκεφάλαια παρουσιάζονται ολοκληρωμένα η σύνταξη και η σημασιολογία της άλγεβρας διεργασιών *BetaBinders*.

Σύνταξη και σημασιολογία

Έχοντας ως πηγή έμπνευσης την *π -calculus*, η άλγεβρα διεργασιών *BetaBinders* υιοθέτησε πολλά στοιχεία της που αφορούν κυρίως το θέμα της επικοινωνίας σε κανάλια μέσω συγχρονισμού. Πολλοί τελεστές της *BetaBinders* έχουν την ίδια σημασιολογία με το π αντίστοιχους στην *π -calculus* και χρησιμοποιούνται με παρόμοιο σκεπτικό. Ουσιαστικά, η *BetaBinders* εξελίσσει την ιδέα της *π -calculus* προσθέτοντας νέες έννοιες στις υπάρχουσες προκειμένου να δημιουργηθεί μια άλγεβρα διεργασιών ιδανική για την μοντελοποίηση βιολογικών συστημάτων.

Για την απόδοση της σύνταξης της *BetaBinders* υποθέτουμε την ύπαρξη ενός αριθμήσιμου μη πεπερασμένου συνόλου ονομάτων N (φτιαγμένα με πεζά γράμματα).

Ορισμός 3.2.4.1:

Ένας βασικός beta συνδέτης (*elementarybetabinder*) έχει είτε την μορφή $\beta(x : \Gamma)$ είτε την μορφή $\beta^h(x : \Gamma)$, όπου:

1. Το όνομα x είναι το υποκείμενο(*subject*) του *betabinder* και
2. Το Γ είναι ο τύπος του υποκειμένου x και αποτελεί ένα μη κενό σύνολο ονομάτων τέτοιο ώστε $x \notin \Gamma$.

Διαισθητικά, ο βασικός *betabinder* $\beta(x : \Gamma)$ χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει την ύπαρξη ενός εν δυνάμει ενεργού συνδέτη ενός *box*. Δηλαδή, ενός συνδέτη που μπορεί να λάβει μέρος σε αλληλεπιδράσεις κατά την προσομοίωση του μοντέλου. Από την άλλη, ο βασικός *betabinder* $\beta^h(x : \Gamma)$ χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει την ύπαρξη ενός ανενεργού εν δυνάμει συνδέτη ενός *κουτιού*. Δηλαδή, ενός συνδέτη ο οποίος είναι αδύνατον να εμπλακεί σε αλληλεπιδράσεις κατά την προσομοίωση του μοντέλου.

Ορισμός 3.2.4.2:

Ένας σύνθετος beta συνδέτης (*compositebetabinder*) παράγεται από την ακόλουθη γραμματική:

$$\mathbf{B} ::= \beta(x : \Gamma) \mid \beta^h(x : \Gamma) \mid \beta(x : \Gamma) \mathbf{B} \mid \beta^h(x : \Gamma) \mathbf{B}$$

Ένας σύνθετος *betabinder* είναι *καλά-σχηματισμένος* (*well-formed*) όταν τα υποκείμενα των επιμέρους βασικών συνδετών του είναι όλα μεταξύ τους διακριτά. Έστω το σύνολο B όλων των καλά-σχηματισμένων *betabinders* να είναι το $B_1, B_2, \dots, B_n, \dots$. Το σύνολο των υποκειμένων όλων των βασικών *betabinders* συμβολίζεται με $sub(B)$ και γράφοντας $B = B_1 B_2$ εννοούμε ότι το B είναι ένας σύνθετος *betabinder* με τους επιμέρους βασικούς *betabinders* B_1 και B_2 .

Οι διεργασίες που είναι ενθυλακωμένες μέσα στα κουτιά (γράφονται με κεφαλαία γράμματα) δίνονται από την ακόλουθη γραμματική:

$$P ::= nil \mid x(w).P \mid \bar{x}(y).P \mid P \mid P \mid \nu y P \mid !P \mid expose(x, \Gamma).P \mid hide(x).P \mid unhide(x).P$$

Για λόγους απλότητας, οι διεργασίες που παράγονται από την πιο πάνω γραμματική ονομάζονται *π-διεργασίες*. Ο τελεστής τερματισμού *nil*, οι ενέργειες εισόδου και εξόδου ($x(w).P$ και $\bar{x}(y).P$ αντίστοιχα), ο τελεστής παράλληλης σύνθεσης ($P|P$), ο περιορισμός (νyP) και ο τελεστής της αντιγραφής (!) έχουν ακριβώς το ίδιο νόημα με τους αντίστοιχους τελεστές στην *π-calculus*.

Τα προθέματα *expose*, *hide* και *unhide* χρησιμοποιούνται για να προκαλέσουν δυναμικές μεταβολές στην εξωτερική επιφάνεια των *boxes*. Αποτελούν νέες έννοιες, διαφορετικές από κάθε έννοια στην *π-calculus* και θα επεξηγηθούν αργότερα.

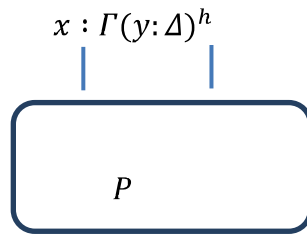
Μια *βιο-διεργασία* (bio-process) παράγεται από την ακόλουθη γραμματική:

$$B ::= Nil \mid \mathbf{B}[P] \mid B \parallel B$$

Ο τελεστής *Nil* αφορά τον τερματισμό ή το αδιέξοδο στο οποίο μπορεί να φτάσει μια *βιο-διεργασία* και αποτελεί το ουδέτερο στοιχείο μιας παράλληλης σύνθεσης *βιο-διεργασιών* με συμβολισμό $B \parallel B$. Η διεργασία *Nil* είναι η απλούστερη *βιο-διεργασία* που μπορεί να υπάρξει.

Σε κάθε *βιο-διεργασία* που αποτελείται από *n* συντρέχοντα στοιχεία αντιστοιχεί μια απλή γραφική σημειογραφία που περιλαμβάνει *n* διακριτά *boxes*, ένα για κάθε συντρέχον στοιχείο. Κάθε *box* περιέχει μια *π-διεργασία* και έχει ακριβώς τόσες *θέσεις* όσοι είναι οι *βασικοί betabinders* (κρυμμένοι ή ενεργοί) στον αντίστοιχο σύνθετο *betabinder*. Στο σχήμα 3.2.4.2 φαίνεται ένα παράδειγμα γραφικής σημειογραφίας της *βιο-διεργασίας* $\beta(x:\Gamma)\beta^h(y:\Delta)[P]$.

Σχήμα 3.2.4.2: Γραφική σημειογραφία της *βιο-διεργασίας* $\beta(x:\Gamma)\beta^h(y:\Delta)[P]$



Η θέση στην οποία τοποθετήθηκαν οι *συνδέτες* στην περίμετρο του πλαισίου του κουτιού στο σχήμα 3.2.4.2 δεν έχει καμία σημασία. Το ίδιο συμβαίνει και με την σειρά στην οποία τοποθετήθηκαν οι *συνδέτες* στην συμβολική αναπαράσταση της διεργασίας. Συνεπώς, οι διεργασίες $\beta(x:\Gamma)\beta^h(y:\Delta)[P]$ και $\beta^h(y:\Delta)\beta(x:\Gamma)[P]$ είναι ισοδύναμες. Το ίδιο συμβαίνει και με την σειρά των *κουτιών* που τοποθετούνται στην παράλληλη σύνθεση υποστοιχείων μιας *βίο-διεργασίας*.

Να σημειωθεί ότι το υποκείμενο ενός συνδέτη μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο στην διεργασία που είναι ενθυλακωμένη μέσα στο *κουτί* (*intra-communication*) ενώ οι αλληλεπιδράσεις που συμβαίνουν με άλλα κουτιά (*inter-communication*) γίνονται με βάση τον τύπο των συνδετών.

Κλείνοντας το υποκεφάλαιο της σύνταξης της BetaBinders άλγεβρας διεργασιών κάνουμε αναφορά στις νέες έννοιες (*expose*, *hide*, *unhide*, *join* και *split*) που εισάγει ο φορμαλισμός.

Ο τελεστής $\text{expose}(x, \Gamma).P$ χρησιμοποιείται για την δυναμική πρόσθεση κάποιου συνδέτη με υποκείμενο x και τύπου Γ στο *box*. Για την διατήρηση του *καλού-σχηματισμού* του *box* θα πρέπει ο νέος *betabinder* να έχει διαφορετικό υποκείμενο (*subject*) από τα υπάρχοντα υποκείμενα στο *box*.

Οι τελεστές $\text{hide}(x).P$ και $\text{unhide}(x).P$ έχουν ως αποτέλεσμα την απόκρυψη και την αποκάλυψη (ενεργοποίηση) ενός ήδη υπάρχοντος *binder* στο *box* αντίστοιχα. Για να εφαρμοστούν όμως αυτοί οι τελεστές απαιτούν από τον συνδέτη με υποκείμενο x να είναι αποκρυμμένος και μη αποκρυμμένος αντίστοιχα.

Τα αξιώματα *join* και *split* μοντελοποιούν την ένωση δυο διακριτών *boxes* και την διάσπαση ενός *box* σε δυο άλλα διακριτά *boxes* αντίστοιχα. Οι ενέργειες *join* και *split* θα γίνουν με βάση τις καθορισμένες συναρτήσεις f_{join} και f_{split} . Για περισσότερες λεπτομέρειες ο αναγνώστης μπορεί να διαβάσει το [7].

Κεφάλαιο 4

Εργαλεία κατασκευής και προσομοίωσης μοντέλων σε άλγεβρες διεργασιών

4.1. Beta WorkBench: Ηγλώσσα BlenX	31
4.1.1. Πλεονεκτήματα του BetaWorkBench	35
4.1.2. Οι πιθανοτικές τιμές στο BetaWorkBench	37
4.1.3. Ηγλώσσα του BetaWorkBench	39
4.2. Visual SPiM	42

4.1. Το BETA WORKBENCH :ΗγλώσσαBlenX

Το περιβάλλον *BetaWorkbench*[9,23] (με συντομογραφία BWB) αποτελεί ένα ισχυρό εργαλείο για την μοντελοποίηση, προσομοίωση και ανάλυση βιολογικών συστημάτων, αφού ξεπερνά κάποιους από τους περιορισμούς που υπάρχουν στα άλλα αντίστοιχα εργαλεία που υπάρχουν και είναι βασισμένα σε άλγεβρες διεργασιών. Ο λόγος είναι ακριβώς επειδή σχεδιάστηκε από την αρχή για την υποστήριξη τέτοιου είδους σκοπών βιολογικού χαρακτήρα. Είναι βασισμένο και υλοποιεί την πρόσφατα δημιουργημένη γλώσσα *BlenX*[21-22] που κατασκευάστηκε για την κατασκευή μοντέλων βιολογικών

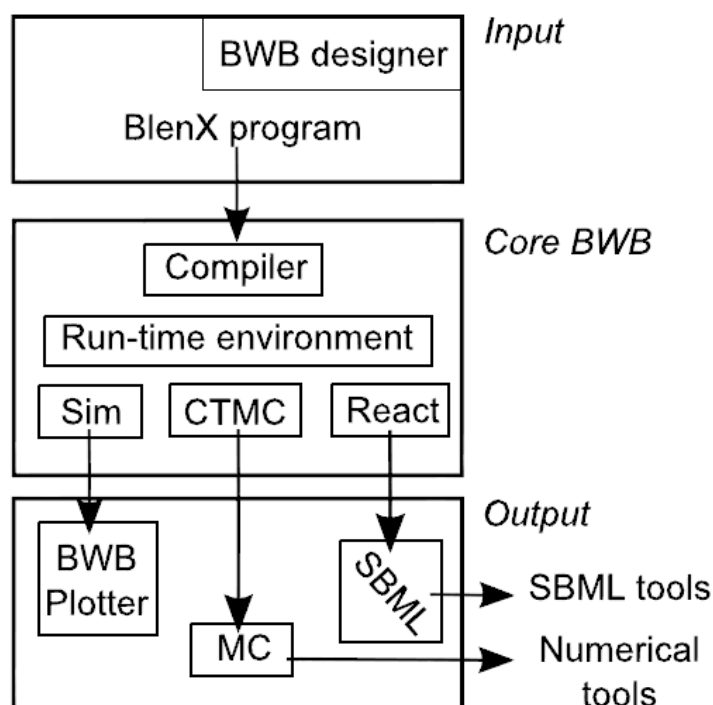
συστημάτων φτιαγμένα στην άλγεβρα διεργασιών *BetaBinders*[7] και προσφέρει μια γκάμα υποστηρικτικών εργαλείων στο χρήστη.

Κύριος στόχος του εν λόγω εργαλείου είναι η διευκόλυνση της διαδικασίας παραγωγής μοντέλων βιολογικών συστημάτων σε διάφορα επίπεδα αφαιρετικότητας. Το BWB επιτρέπει την χρησιμοποίηση *boxes* για την γραφική αλλά και κειμενική αναπαράσταση βιολογικών οντοτήτων όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα ένζυμα, τα κύτταρα ή ακόμα και οι ιστοί. Τα *boxes* αλληλεπιδρούν με σκοπό την επίτευξη και ολοκλήρωση βιολογικών λειτουργικοτήτων μέσω κάποιων ειδικών στοιχείων που φέρουν (*binders*) και μιας εσωτερικής διεργασίας που χειρίζεται αυτές τις αλληλεπιδράσεις και τα αποτελέσματα τους, προσομοιώνοντας με αυτόν τον τρόπο την συμπεριφορά της βιολογική οντότητας στην οποία αντιστοιχεί.

Το σχήμα 4.1.1. απεικονίζει την λογική δομή του περιβάλλοντος *BetaWorkBench* δείχνοντας την χρησιμότητα του κάθε εργαλείου που παρέχει καθώς και την φάση χρησιμοποίησης του καθ' ενός από αυτά.

Ο πυρήνας του BWB (*CoreBWB*) είναι μια εφαρμογή εντολών (*commandline application*) στην οποία είναι ενθυλακωμένα τρία άλλα εργαλεία: τον *BWBsimulator* (προσομοιωτής), τον *BWBCTMCgenerator* (παραγωγός αλυσίδων Markov) και τον *BWBreactions generator* (παραγωγός αντιδράσεων). Τα τρία αυτά εργαλεία χρησιμοποιούν τον *BlenXcompiler* (μεταγλωττιστής της γλώσσας *BlenX*) και το *BlenXruntimeenvironment*. Συγκεκριμένα, ο πυρήνας του BWB δέχεται σαν είσοδο αρχεία κειμένου που αντιστοιχούν σε προγράμματα στην γλώσσα *BlenX*. Τα αρχεία αυτά, αφού περάσουν από τον μεταγλωττιστή μεταφράζονται σε μια *runtime* αναπαράσταση η οποία αποθηκεύονται στο *runtimeenvironment*.

Σχήμα 4.1.1[22]: Η λογική δομή του BetaWorkBench



Ο *BWB* προσομοιωτής είναι μια στοχαστική μηχανή προσομοίωσης η οποία υλοποιεί μια αποδοτική παραλλαγή των αλγορίθμων Gillespie [24-25]. Το *runtimeenvironment* παρέχει την δυνατότητα στον προσομοιωτή να ελέγχει την τρέχουσα κατάσταση του συστήματος και να κάνει αλλαγές σε αυτήν. Ο προσομοιωτής από την πλευρά του χειρίζεται τις μεταβολές του *runtimeenvironment* στον χρόνο με πιθανοτικό/στοχαστικό τρόπο και ενεργεί πάντοτε διαφυλάττοντας τις αρχές της γλώσσας.

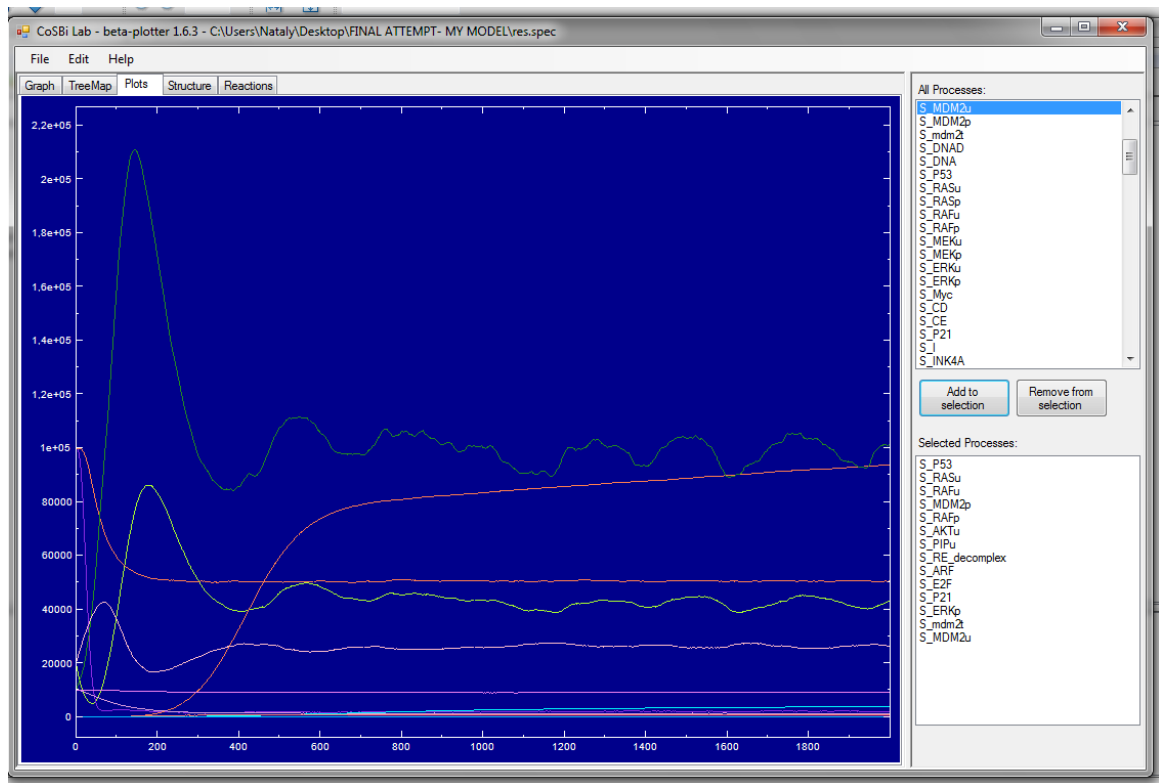
Ο *CTMCgenerator* χρησιμοποιείται για να παράξει διεργασίες γνωστές ως *continuous-timeMarkovchains* εφόσον το μοντέλο είναι πεπερασμένο και τα *rates* που χρησιμοποιούνται σε αυτό ακολουθούν την εκθετική κατανομή. Για περισσότερες πληροφορίες ο αναγνώστης μπορεί να διαβάσει το [22].

Ο *BWBreactionsgenerator* προσδιορίζει τις αλλαγές που μπορεί να συμβούν από τις οντότητες και τα σύμπλοκα καθώς αυτά παράγονται από την εκτέλεση του προγράμματος *BlenX*. Για περισσότερες πληροφορίες ο αναγνώστης μπορεί να διαβάσει το [22].

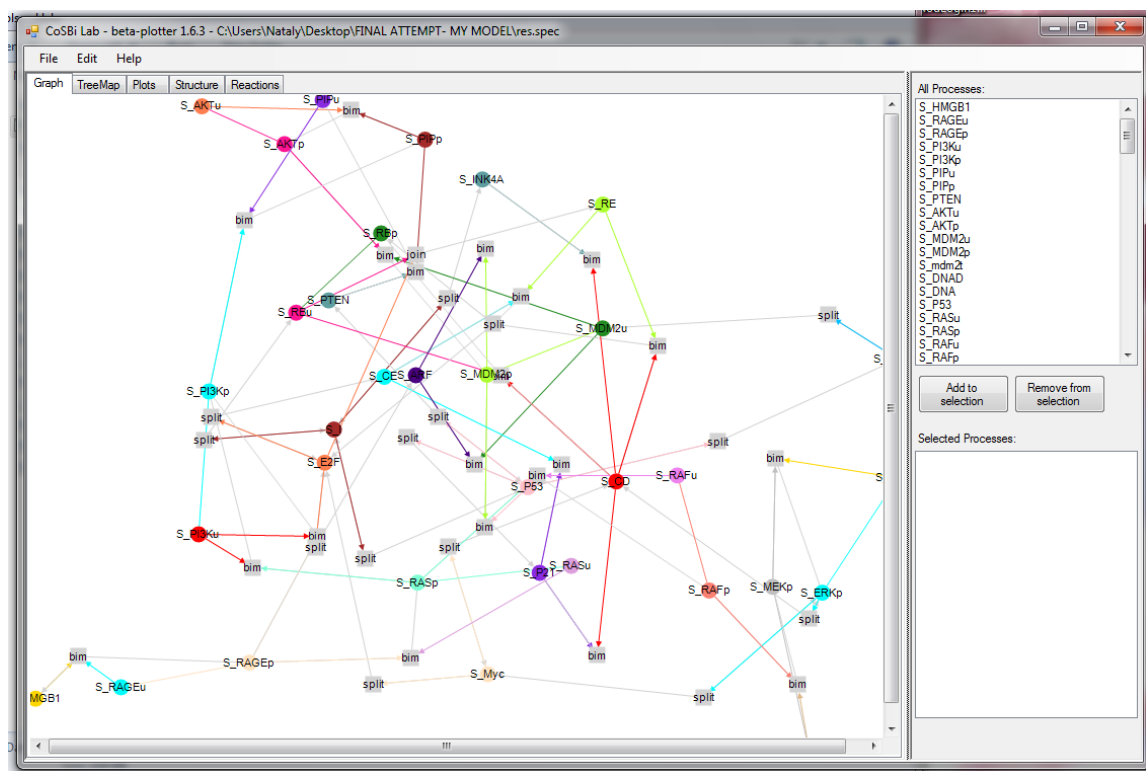
Πέραν των πιο πάνω εργαλείων που ανήκουν στον πυρήνα του *BetaWorkbench*, στην γκάμα περιλαμβάνονται και υποστηρικτικά εργαλεία για την παραγωγή και διάβασμα αρχείων στην είσοδο και έξοδο του πυρήνα αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η δημιουργία μοντέλων στην γλώσσα *BlenX* υποστηρίζεται από τον *BWBdesigner*, ενώ το διάβασμα των αποτελεσμάτων υποστηρίζεται από τον *BWBplotter*.

Ο *BWBdesigner* είναι ένα εργαλείο με γραφικό περιβάλλον που επιτρέπει την συγγραφή προγραμμάτων/μοντέλων τόσο στην μορφή κειμένου (κώδικας) όσο και σε γραφική μορφή (σχήματα). Η κάθε μια από αυτές τις μορφές μπορεί να μετατραπεί στην άλλη, ωστόσο για μεγάλα προγράμματα δεν ενδείκνυται η συγγραφή με γραφική αναπαράσταση αφού η πολυπλοκότητα του μοντέλου είναι αυξημένη. Στην τρέχουσα έκδοση του *designer* (version 2009) υπάρχει συντακτικός έλεγχος κατά την ώρα συγγραφής του μοντέλου και υποστηρίζεται η παραγωγή τριών αλληλοεξαρτώμενων αρχείων κειμένου που θα διοχετευτούν ως είσοδος στα εργαλεία του πυρήνα του *BWB*. Περισσότερα για τα τρία αρχεία κειμένου αναφέρονται στο υποκεφάλαιο που αφορά την γλώσσα του εργαλείου.

Ο *BWBplotter* είναι ένα γραφικό εργαλείο που υποστηρίζει το διάβασμα και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων από τα αρχεία που παράγονται ως έξοδος της προσομοίωσης του μοντέλου. Η παρουσίαση των αποτελεσμάτων μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους, ανάλογα με το τι θέλει να μελετήσει ο χρήστης. Στα πλαίσια της παρουσίασης αποτελεσμάτων υποστηρίζονται τα εξής: γραφικές παραστάσεις της συγκέντρωσης των ειδών ως προς τον χρόνο (εικόνα 4.1.1), γράφοι παρουσίασης των αντιδράσεων που συνέβησαν κατά την προσομοίωση του μοντέλου, όψεις που δείχνουν την σχέση μεταξύ οντοτήτων και αντιδράσεων και η τοπολογία του δικτύου (εικόνα 4.1.2). Το σύνολο όλων αυτών των οπτικοποιημένων διευκολύνσεων των αποτελεσμάτων σε συνδυασμό με την άμεση μεταξύ τους συσχέτιση αποτελεί δυνατό στοιχείο στην διάθεση των ερευνητών προκειμένου να διεξάγουν συμπεράσματα για τις ιδιότητες του μοντελοποιημένου συστήματος. Επιπλέον, ο *BWBplotter* έχει την δυνατότητα να διαχειρίζεται τεράστια αρχεία αποτελεσμάτων μεγέθους μέχρι και κάποιων δεκάδων GigaBytes.



Εικόνα 4.1.1: BWBPlotter: Η συγκέντρωση των ειδών ως προς τον χρόνο



Εικόνα 4.1.2: BWBPlotter: Η τοπολογία του δικτύου των ειδών.

4.1.1. Πλεονεκτήματα του BetaWorkBench

Υπάρχουν κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά [23] στοιχεία στην προσέγγιση που υλοποιεί το περιβάλλον *BetaWorkBench*, τα οποία προ ϑίδο 11 σε αυτό μεγαλύτερη αξία σε σύγκριση με άλλα αντίστοιχα εργαλεία που στηρίχτηκαν στις άλγεβρες διεργασιών αλλά και σε μαθηματικούς/χημικούς τρόπους μοντελοποίησης. Πιοκάτωπαρατίθενταια βασικότεραμεταξύ αυτών χαρακτηριστικά:

- i. Οι *binders*(στοιχεία των *boxes*)χαρκτηρίζονται από κάποιο *τύπο*, ο οποίος είναι δυνατόν να μεταβληθεί δυναμικά κατά την προσομοίωση του μοντέλου. Ο *τύπος* αυτός είναι υπεύθυνος για την απόδοση ιδιοτήτων στον *binder*με αποτέλεσμα όταν αυτός μεταβληθεί σε κάποιον άλλο *τύπο* οι ιδιότητες του ίδιου *binder*να αλλάζουν. Επιπλέον, ένας *binder*είναι δυνατόν να είναι είτε *ενεργός* (διαθέσιμος για εμπλοκή σε αντιδράσεις), είτε *κρυμμένος* (αδύνατον να εμπλακεί σε οποιαδήποτε αντίδραση) είτε *σε σύμπλοκο* (όταν είναι δεσμευμένος με κάποιον άλλο *binder*ενός άλλου *box*). Αυτή η κατάσταση ενός *binder*είναι επίσης εφικτό να αλλάξει δυναμικά κατά την προσομοίωση του μοντέλου, όπως επίσης είναι εφικτό να δημιουργηθεί δυναμικά ένας νέος *binder*σε ένα *box*. Αυτές οι δυνατότητες δεν υποστηρίζονται από άλλα αντίστοιχα εργαλεία βασισμένα σε άλγεβρες διεργασιών.
- ii. Στο BWBo μηχανισμός αλληλεπίδρασης σε κανάλια μέσω συγχρονισμού δεν επιβάλλει *συμπληρωματικότητα* στα ονόματα των καναλιών, πράγμα το οποίο είναι απαραίτητο στα άλλα εργαλεία. Με τον όρο *συμπληρωματικότητα*στο όνομα ενός καναλιού εννοούμε το ότι για να υπάρξει επικοινωνία σε ένα κανάλι χρειάζεται να υπάρχουν δυο συμπληρωματικές ενέργειες εισόδου και εξόδου σε κανάλι που φέρει το ίδιο ακριβώς όνομα. Ως αποτέλεσμα της απουσίας αυτού του περιορισμού, υπάρχει ευελιξία στην ονοματοδότηση των καναλιών καθώς φτιάχνεται το μοντέλο αφού δεν χρειάζεται να υιοθετηθεί κάποια γενική πολιτική ονοματοδότησης. Επιπλέον, αυτό βοηθά και στην παραγωγή αυξητικών και κατανεμημένων μοντέλων καθώς επίσης και στην σύνθεση επιμέρους μοντέλων.

- iii. Υπάρχει η δυνατότητα 1-1 αντιστοιχίας ανάμεσα στα είδη βιολογικών οντοτήτων και *boxes*. Μια βιολογική οντότητα μπορεί να βρίσκεται σε ηδιαφορετικές καταστάσεις και αυτό αντιστοιχεί σε ένα μόνο *box*, σε αντίθεση με τα άλλα εργαλεία μαθηματικού/χημικού χαρακτήρα που απαιτούν ηδιαφορετικές μεταβλητές.
- iv. Το BWB υποστηρίζει τον ορισμό συμπλόκων (σύνολα οντοτήτων ενωμένα μεταξύ τους μέσω συγκεκριμένων *binders*) καθώς επίσης και την δυναμική παραγωγή τους κατά την προσομοίωση του μοντέλου. Υποστηρίζεται ο ορισμός αρχικής συγκέντρωσης τέτοιων ειδών αλλά και δημιουργία αυτών εφόσον έχει οριστεί κάτι τέτοιο στις σχέσεις μεταξύ των *binders*. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει ως αποτέλεσμα τον μειωμένο αριθμό στοιχείων που πρέπει να οριστούν στην αρχική κατάσταση του συστήματος.
- v. Η προδιαγραφή ποσοτικοποιημένων παραμέτρων οι οποίες καθορίζουν την εξελικτική πορεία της προσομοίωσης ενός μοντέλου είναι δυνατόν να γίνει κάνοντας χρήση *καθολικών συναρτήσεων (general functions)* των οποίων η τιμή επιστροφής υπολογίζεται κατά την ώρα της προσομοίωσης. Τέτοιες παράμετροι είναι τα *rates* τα οποία επηρεάζουν άμεσα την πιθανότητα να συμβεί μια ενέργεια και πιθανόν να εξαρτώνται από την συγκέντρωση κάποιου είδους σε μια δεδομένη χρονική στιγμή της προσομοίωσης. Επίσης, υποστηρίζεται η δήλωση *μεταβλητών κατάστασης (state variables)*, των οποίων οι τιμές μπορούν να ληφθούν υπόψη κατά τη προσομοίωση του μοντέλου για διάφορους λόγους (π.χ. ενεργοποίηση συνθηκών) και να παρουσιαστούν στις γραφικές παραστάσεις των αποτελεσμάτων. Η ανάγκη για δυναμικό υπολογισμό τιμών μέσα από συναρτήσεις και μεταβλητές προσδίδουν στο μοντέλο γενική και πιο ρεαλιστική διάσταση σε σύγκριση με τα μοντέλα που κατασκευάζονται με βάση μόνο τον αλγόριθμο Gillespie [24-25]. Ο λόγος είναι επειδή τα *rates* δεν είναι πάντοτε σταθερές και στατικά συνδεδεμένα με τα αλληλεπιδρώντα κανάλια. Τα σημεία που αναφέρθησαν είναι μοναδικά και δεν υποστηρίζονται από άλλα αντίστοιχα εργαλεία, γεγονός το οποίο δίνει σαφέστατα πλεονεκτική θέση στο BWB αφού προσφέρει μεγαλύτερη ευελιξία απ'ότι τα υπόλοιπα εργαλεία και μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγαλύτερη κλίμακα προβλημάτων.

- vi. Η έννοια των *events* όπως υποστηρίζεται στο BWB είναι σημαντική. Η διαγραφή και η δημιουργία οντοτήτων στο σύστημα, η ένωση δυο διακριτών οντοτήτων σε μια τρίτη αλλά και η διάσπαση μιας οντότητας σε δυο άλλες διακριτές οντότητες είναι ενέργειες απαραίτητες για την μοντελοποίηση βιολογικών συστημάτων και στο BWB υλοποιούνται μέσω των *events*. Τα *events* έχουν σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση τέτοιου είδους ενεργειών μόνο όταν ικανοποιείται κάποια *συνθήκη* (μπορεί να είναι και *ανεξάρτητα συνθηκών*) και οι ενέργειες αυτές συγκαταλέγονται στην λίστα των υπόλοιπων πιθανών ενεργειών που μπορούν να συμβούν, συνοδευμένες πάντοτε με κάποιο *rate*. Οι *συνθήκες* που διέπουν τα *events* είναι δυνατόν να αφορούν τον *χρόνο* ή/και τα *βήματα προσομοίωσης*, να εξαρτώνται από τιμές μεταβλητών ή από τις συγκεντρώσεις ο κυττάρων. Η ύπαρξη των *events* είναι σημαντική για την μοντελοποίηση διαταράξεων που μπορούν να προκληθούν στο σύστημα όταν συγκεκριμένες συνθήκες ενεργοποιούνται κατά την προσομοίωση, επιτρέποντας μας να μελετήσουμε την γενική επίδραση τους στο σύστημα. Συνεπώς, η χρήση των *events* είναι απαραίτητη στην διεξαγωγή *in-silico* πειραμάτων και κανένα άλλο εργαλείο βασισμένο σε άλγεβρες διεργασιών δεν υποστηρίζει *events* κατά τον τρόπο που περιγράφηκε πιο πάνω.

4.1.2. Οι πιθανοτικές τιμές στο BetaWorkBench

Σε αυτό το υποκεφάλαιο αναλύεται ο τρόπος επεξεργασίας των πιθανοτικών τιμών [22] που διέπουν τα μοντέλα στο BWB και επηρεάζουν άμεσα την εξελικτική πορεία των προσομοιώσεων. Περιγράφεται ο τρόπος υπολογισμού των πιθανοτήτων των ενεργοποιημένων προς εκτέλεση ενεργειών/αντιδράσεων.

Για κάθε κανάλι αλληλεπίδρασης R_j υπάρχει μια συνάρτηση, γνωστή ως *propensity function*, η οποία ορίζεται ως :

$$\alpha_\mu = h_\mu c_\mu \text{ για } \mu=1,\dots,M$$

Όπου:

- μ είναι ο αριθμός των καναλιών αλληλεπίδρασης, δηλαδή ο αριθμός των ειδών αλληλεπίδρασης στις οποίες προβαίνουν τα μόρια
- h_μ είναι ο αριθμός των συνδιασμών των διακριτών ουσιοτήτων που μπορούν να χρησιμοποιήσουν το κανάλι για να εκτελέσουν την αντίδραση R_μ . Ο τρόπος υπολογισμού της παραμέτρου h_μ και συνεπώς της τιμής α_μ ποικίλει ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που αφορά.
- c_μ είναι μια σταθερά που εξαρτάται από τις φυσικές ιδιότητες των οντοτήτων που θα προβούν στην αντίδραση και είναι γνωστή ως *base rate* ή απλά *rate* μιας ενέργειας
- η τιμή της συνάρτησης α_μ αποκαλείται ως *actual rate*

Επίσης, ισχύει $\alpha_0 = \sum_{\mu=1}^M \alpha_\mu$.

Ο αλγόριθμος Gillespie παράγει την εξίσωση *Chemical Master Equation (CME)* χρησιμοποιώντας την *propensity function*. Διαισθητικά, αυτή η εξίσωση δείχνει την στοχαστική εξέλιξη του συστήματος στο χρόνο, η οποία αποτελεί μια *αλυσίδα Markov*.

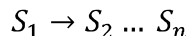
Η διαδικασία *ακριβής στοχαστική προσομοίωση (exact stochastic simulation)* υπολογίζει αριθμητικά την στοχαστική εξέλιξη στο χρόνο ενός βιοχημικού συστήματος [25]. Η διαδικασία στηρίζεται στην συνάρτηση *πυκνότητας πιθανοτήτων αντιδράσεων (reaction probability density)* $P(\tau, \mu)$, η οποία υπολογίζει την πιθανότητα να συμβεί κάποια αντίδραση R_μ τη χρονική στιγμή τ .

Ο τύπος της $P(\tau, \mu)$ δίνεται πιο κάτω:

$$P(\tau, \mu) = \begin{cases} \alpha_\mu \exp(-\alpha_0 \tau), & \text{εάν } 0 \leq \tau \leq \infty \text{ και } \mu = 1, \dots, M \\ 0, & \text{διαφορετικά} \end{cases}$$

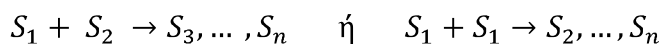
Όπου α_μ είναι η συνάρτηση *propensity*.

Οι αντιδράσεις που εμπλέκουν μόνο ένα είδος οντοτήτων αποτελούν το απλούστερο είδος αντιδράσεων που μπορούμε να συναντήσουμε στο BWB. Ονομάζονται *μονομοριακές αντιδράσεις* (*monomolecular reactions*) και έχουν την μορφή:



Στις *μονομοριακές αντιδράσεις* η παράμετρος h_μ ισούται με το n , όπου n είναι η συγκέντρωση (*cardinality*) του είδους S_1 .

Πέραν των *μονομοριακών αντιδράσεων* υπάρχει ακόμα ένα είδος αντίδρασης. Πρόκειται για αντιδράσεις που εμπλέκουν δυο οντότητες του ίδιου ή διαφορετικού είδους, γνωστές ως *διμοριακές αντιδράσεις* (*bimolecular reactions*). Σε αυτές τις περιπτώσεις οι αντιδράσεις έχουν την μορφή:



Για την εύρεση της παραμέτρου h_μ , πρέπει να υπολογίσουμε το πλήθος όλων των πιθανών αντιδράσεων που μπορούν να συμβούν μεταξύ των στοιχείων του πρώτου και του δεύτερου είδους. Εάν θεωρήσουμε ότι οι συγκεντρώσεις των ειδών S_1 και S_2 είναι n και m αντίστοιχα, τότε στην πρώτη περίπτωση το h_μ θα ισούται με $n * m$ και στην δεύτερη θα ισούται με $\frac{n*(n-1)}{2}$.

Όταν πρόκειται για *rates* ορισμένα ως σταθερές τότε το $h_\mu = 1$ αφού δεν μας ενδιαφέρει ο αριθμός των συνδιασμών. Συνεπώς, χρησιμοποιείται μόνο η σταθερά c_μ (*base rate*) στον προαναφερόμενο τύπο υπολογισμού της συνάρτησης *propensity*. Όταν το *rate* υπολογίζεται μέσω μιας συνάρτησης, καταργούνται οι πιο πάνω θεωρίες.

4.1.3. Η γλώσσα του BetaWorkBench

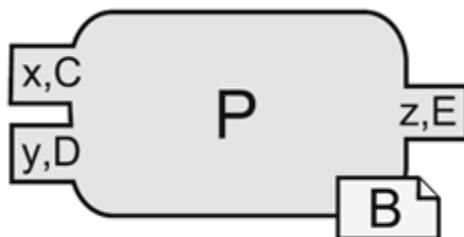
Το *Beta WorkBench* (BWB) υποστηρίζει την πρόσφατα δημιουργημένη στοχαστική γλώσσα προγραμματισμού *BlenX* [21-22]. Πρόκειται για μια γλώσσα που εξυπηρετεί καθαρά τις ανάγκες μοντελοποίησης βιολογικών συστημάτων χωρίς ωστόσο αυτό να σημαίνει ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μοντελοποίηση άλλων οντοτήτων οι οποίες χρησιμοποιούν την επικοινωνία ως μέσο αλληλεπίδρασης. Η γλώσσα

BlenX στηρίζεται στην άλγεβρα διεργασιών *BetaBinders* μεταφέροντας ουσιαστικά τις αρχές και τις ιδέες μοντελοποίησης της σε εντολές κώδικα που απαρτίζουν ένα πρόγραμμα-μοντέλο και το οποίο μπορεί να προσομοιωθεί.

Ένα πρόγραμμα-μοντέλο γραμμένο στην *BlenX* αποτελείται από τρία επιμέρους αρχεία (το *αρχείο του κυρίως προγράμματος*, το *αρχείο δηλώσεων* και το *αρχείο δήλωσης τύπων και σχέσεων*) τα οποία διοχετεύονται για εκτέλεση στον *προσομοιωτή* του BWB. Ο *προσομοιωτής* στον οποίο υπάρχει υλοποιημένη μια αποδοτική παραλλαγή του αλγορίθμου Gillespie [24-25], θα παράξει μια στοχαστική προσομοίωση χρησιμοποιώντας τις ποσοτικοποιημένες πληροφορίες που υπάρχουν στο μοντέλο.

Η γλώσσα *BlenX* αναπαριστά μια βιολογική οντότητα (π.χ. πρωτεΐνη, ένζυμο, κύτταρο) σαν μια υπολογιστική συσκευή, το λεγόμενο *κουτί*, το οποίο συνθέτεται από ένα σύνολο *διεπαφών* (*interfaces*) και ένα *εσωτερικό πρόγραμμα* (*internal program*). Οι *διεπαφές* αντιστοιχούν στους *συνδέτες* (από την *BetaBinders*) και χαρακτηρίζονται από κάποιο *τύπο*. Μέσω αυτών, το *κουτί* μπορεί να επικοινωνήσει με άλλα *κουτιά* στο εξωτερικό του περιβάλλον εφόσον οι *τύποι* των *διεπαφών* τους είναι συμβατοί. Για να είναι συμβατοί δυο *τύποι* θα πρέπει να υπάρχει δηλωμένη μια *σχέση* ή *συγγένεια* στο μοντέλο για τους *τύπους* αυτούς και το θέμα αυτό επεξηγείται καλύτερα πιο κάτω. Το *εσωτερικό πρόγραμμα* αποδίδει με κώδικα την ρεαλιστική συμπεριφορά της βιολογικής οντότητας στην οποία αντιστοιχεί. Υλοποιεί ουσιαστικά, τον μηχανισμό με τον οποίο αντιδρά η οντότητα σε εξωτερικά ερεθίσματα και παρέχει την δυνατότητα μεταβολών στην συμπεριφορά της όταν αυτή έχει αλληλεπιδράσει με μια άλλη οντότητα μέσω κάποιας *διεπαφής* ή όταν έχει ενεργήσει από μόνη της εκτελώντας μια εσωτερική ενέργεια (*μονομοριακή αντίδραση*). Μάλιστα, είναι δυνατόν να συμβούν μεταβολές στο είδος και τα χαρακτηριστικά άλλων *διεπαφών*, άσχετων με την ενέργεια που μόλις έχει συμβεί. Στην εικόνα 4.1.3.1 υπάρχει μια γραφική σημειογραφία ενός τυχαίου *κουτιού* στην γλώσσα *BlenX*. Τα μικρότερα τετράγωνα παριστάνουν τις *διεπαφές* του *κουτιού* οι οποίες χαρακτηρίζονται από δυο παραμέτρους. Η μια παράμετρος λέγεται *υποκείμενο* και είναι τα γράμματα x,y,z στην εικόνα και η άλλη παράμετρος αφορά τον *τύπο* των *διεπαφών* και είναι τα γράμματα C, D, E. Το P είναι το *εσωτερικό πρόγραμμα* και το Βαφορά το προσδιοριστικό

όνομα του *κουτιού*. Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την σύνταξη και τις δυνατότητες της γλώσσας *BlenX* ο αναγνώστης μπορεί να αποταθεί στα [21-22].



Εικόνα 4.1.3.1: Γραφική σημειογραφία κουτιού στην BlenX

Πιο κάτω γίνεται αναφορά για το κάθε ένα από τα τρία αρχεία της γλώσσας *BlenX*.

Το *αρχείο του κυρίως προγράμματος(programfile)* περιέχει την βασική δομή του προγράμματος-μοντέλου και έχει την επέκταση “.prog”. Στο αρχείο αυτό υπάρχει η δήλωση όλων των *κουτιών* του συστήματος.

Το *αρχείο δηλώσεων(declarationsfile)* περιέχει την δήλωση όλων των σταθερών, μεταβλητών και συναρτήσεων που χρησιμοποιούνται από το κυρίως πρόγραμμα, έχει την επέκταση “.func” και η ύπαρξη του είναι προαιρετική.

Το *αρχείο δήλωσης τύπων και σχέσεων(interfacesfile)* περιέχει την δήλωση όλων των δυνατών *τύπων* που μπορούν να χαρακτηρίσουν ένα *συνδέτη* καθώς και ποσοτικοποιημένες πληροφορίες (*ρυθμούς αντιδράσεων*) σχετικές με την δυνατότητα αλληλεπίδρασης μεταξύ *τύπων*. Σε αυτό το αρχείο δηλώνονται ρητά ποιοι *τύποι* είναι συμβατοί για να προβούν σε αλληλεπίδραση και για να δημιουργήσουν σύμπλοκα με βάση τον *ρυθμό αντίδρασης*. Αυτές οι πληροφορίες ονομάζονται *σχέσεις ή συγγένειες(affinities)* μεταξύ *τύπων* και αποτελούν ιδιομορφία της γλώσσας *BlenX*. Οι *σχέσεις* μεταξύ ζευγαριών από *συνδέτες* αποτελούν τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης για την γλώσσα *BlenX* στα κανάλια επικοινωνίας και έχουν πλεονεκτήματα σε σχέση με τους διαφορετικούς μηχανισμούς αλληλεπίδρασης που εφαρμόζουν άλλες γλώσσες μοντελοποίησης βιολογικών συστημάτων. Ο πιο διαδεδομένος μηχανισμός αλληλεπίδρασης που εφαρμόζεται βασίζεται στην ιδέα της *ακριβούς συμπληρωματικότητας (exact complement)* στα ονόματα των

καναλιών επικοινωνίας. Η ιδέα αυτή ωστόσο περιορίζει την ονοματοδοσία των καναλιών και δυσκολεύει τυχόν μελλοντικές αλλαγές στα μοντέλα. Τέλος, το αρχείο αυτό έχει την επέκταση “.types”.

4.2. VISUALSPiM

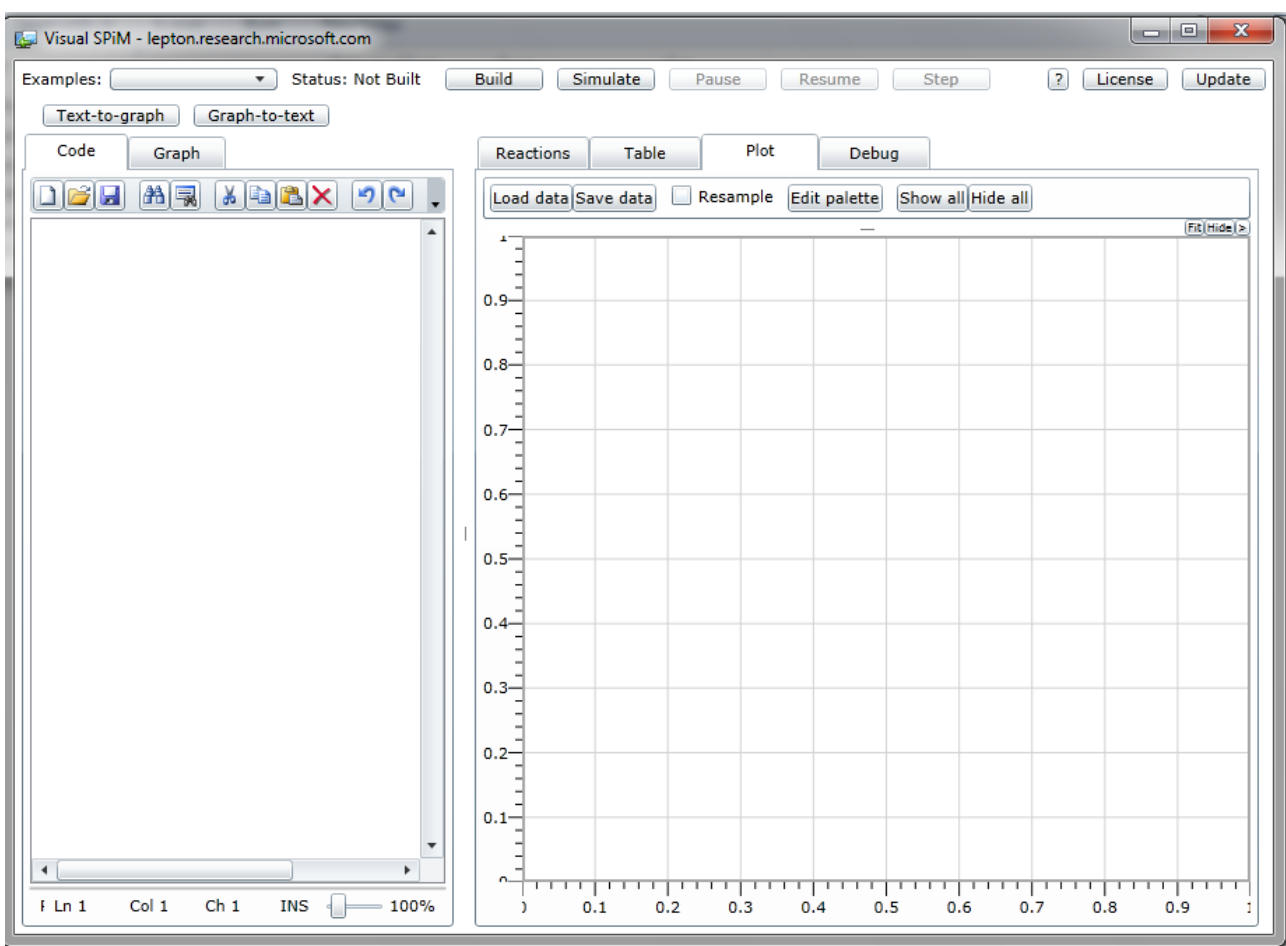
Το VisualSPiM [3,8] (version 0.05,2008) είναι ένας προσομοιωτής βιολογικών μοντέλων που προέρχεται από την ερευνητική ομάδα της Microsoft (MicrosoftResearch). Τα μοντέλα συντάσσονται στην γλώσσα[26] του εργαλείου η οποία βασίζεται σε μια γραφική παραλλαγή της στοχαστικής π -calculus [27].

Πρόκειται για ένα πολύ εύχρηστο εργαλείο με πολύ καλό υποστηρικτικό υλικό (documentation) τόσο για την ίδια τη χρήση του όσο και για την γλώσσα συγγραφής μοντέλων σε αυτό. Ως εργαλείο παρέχει πολλές χρήσιμες δυνατότητες καθώς και ευελιξία στον χρήστη μέσα από τις διάφορες λειτουργίες που υποστηρίζει. Σημαντικό πλεονέκτημα για το εργαλείο αυτό αποτελεί το γεγονός ότι όλες οι διαδικασίες για την μοντελοποίηση ενός βιολογικού συστήματος όπως είναι η συγγραφή, η προσομοίωση και η παρουσίαση των αποτελεσμάτων της προσομοίωσης, υποστηρίζονται από ένα και μόνο εργαλείο με γραφικό περιβάλλον σε αντίθεση με το εργαλείο BetaWorkBench [9,23].

Όλα αυτά τα πλεονεκτήματα του VisualSPiM κατέστησαν το εργαλείο ως πρώτη επιλογή για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δυστυχώς, στην πορεία προέκυψε η ανάγκη για χρησιμοποίηση συναρτησιακών πιθανοτικών τιμών (functional rates), λειτουργία η οποία δεν υποστηρίζεται από την τρέχουσα έκδοση του εργαλείου και για τον λόγο αυτό το εργαλείο αυτό τελικά απορρίφθηκε.

Στην εικόνα 4.2.1 παρουσιάζεται η κύρια διεπιφάνεια του εργαλείου VisualSPiM. Υπάρχει η δυνατότητα συγγραφής κώδικα για το μοντέλο στα αριστερά και τα αποτελέσματα της προσομοίωσης θα παρουσιαστούν στο δεξιό μέρος της διεπιφάνειας.

Στην Για περισσότερες πληροφορίες σχετικά με την χρήση και τις λειτουργίες που προσφέρει το εργαλείο ο αναγνώστης ανά πάσα στιγμή μπορεί να πατήσει το κουμπί με την ένδειξη «?».



Εικόνα 4.2.1: Η κύρια διεπιφάνεια του εργαλείου SPiM. Από την διεπιφάνεια αυτή ο χρήστης μπορεί να πλοηγηθεί σε όλες τις λειτουργίες που υποστηρίζονται, να συγγράψει το μοντέλο και να στα δεξιά τα αποτελέσματα της προσομοίωσης

Κεφάλαιο 5

Βιολογικό Σύστημα: Το σηματοδοτικό δίκτυο μονοπατιών της πρωτεΐνης HMGB1

5.1. Εισαγωγή	44
5.2. Το βιολογικό σύστημα που μοντελοποιήθηκε	46
5.2.1. Περιγραφή των σηματοδοτικών μονοπατιών	47
5.2.2. Αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών	50
5.3. Μοντελοποίηση βιολογικού συστήματος στην BlenX	50
5.3.1. Λεπτομέρειες μοντελοποίησης	51
5.3.2. Κατασκευή μοντέλου	51

5.1. Εισαγωγή

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας μελετήθηκε το HMGB1 (High-mobility group box-1) σηματοδοτικό μονοπάτι (HMGB1 signaling pathway / signaltransduction) [4], το οποίο έχει αποδειχθεί μέσα από έρευνες ότι εμπλέκεται σε καρκινογένεσεις. Συγκεκριμένα, η υπερσυγκέντρωση της πρωτεΐνης HMGB1 σε συνδυασμό με τους υποδοχείς (receptors) της για σχηματισμό τελικών προϊόντων προχωρημένης

γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end products - RAGEs) και τους ιδιότυπους υποδοχείς (toll-like receptors - TLRs) είναι παρόντες σε πολλές μορφές καρκίνων όπως είναι ο καρκίνος του μαστού και του παγκρέατος. Επίσης, πολλές πρωτεΐνες που ενεργοποιούνται και λαμβάνουν μέρος στα σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζει η πρωτεΐνη HMGB1 εμφανίζονται μεταλλαγμένες ή/και σε αυξημένη συγκέντρωση σε περιστατικά καρκίνων.

Ο κύκλος ζωής ενός κυττάρου είναι αυστηρά ρυθμισμένος και ελέγχεται από ένα σύνθετο δίκτυο σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκουν εκατοντάδες πρωτεϊνών. Εάν κάποιες σημαντικές πρωτεΐνες μεταλλαχτούν ή υπάρξουν ελαττωματικές λειτουργίες στους μηχανισμούς σηματοδότησης (*signaling mechanisms*), τότε η κανονική λειτουργία του κύκλου ζωής θα διαταραχτεί προκαλώντας αναπάντεχες συνέπειες. Τέτοιες ανωμαλίες πολύ πιθανόν να προκαλέσουν την εμφάνιση καρκινωμάτων στον οργανισμό. Επίσης, οι εξωκυττάρια μεταλλαγμένες πρωτεΐνες πιθανόν να αναπτύξουν δεσμούς με τους υποδοχείς τους (receptors), ενεργοποιώντας σηματοδοτικά μονοπάτια που συμβάλουν στον πολλαπλασιασμό αντί την *απόπτωση* καρκινικών κυττάρων.

Η πρωτεΐνη HMGB1 υπάρχει σε όλα σχεδόν τα ευκαρυωτικά κύτταρα και είναι *DNA-δεσμευτική* (DNA-binding nuclear protein). Όταν αναπτύξει δεσμούς με υποδοχείς επιφανειών (surface receptors) μπορεί να ενεργοποιήσει μια σειρά από σηματοδοτικές οντότητες όπως είναι οι mitogen-activated protein kinases (MAPKs) και η πρωτεΐνη AKT, οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη όγκων και στην εμφάνιση φλεγμονών.

Η πρωτεΐνη HMGB1 έχει ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη διαφορετικών τύπων καρκίνων σε πολλές μελέτες που έγιναν σε *invitro* πειράματα. Μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης HMGB1 σε πολλά είδη όγκων και επιταχύνει την εξέλιξη του κύκλου ζωής των κυττάρων προκαλώντας ασύστολο πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων. Σε έρευνες με πειράματα σε καρκινικά κύτταρα του παγκρέατος και των πνευμόνων, παρατηρήθηκε ότι εάν στοχεύσουμε στον θάνατο ή την καταστολή της πρωτεΐνης HMGB1 και των υποδοχέων RAGE θα επιτύχουμε αυξημένη *απόπτωση* και καταστολή των καρκινικών κυττάρων.

Οι ανταλλαγές σημάτων που προκαλούνται από την HMGB1 μέσα στον οργανισμό επηρεάζουν δυο πολύ βασικές λειτουργίες των κυττάρων: την *απόπτωση* και τον

πολλαπλασιασμό. Η απόπτωση ρυθμίζεται από την πρωτεΐνη p53, ενώ ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων από την πρωτεΐνη Cyclin E, πρωτεΐνες οι οποίες δρουν σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Η πρωτεΐνη p53 είναι μια από τις σημαντικότερες ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες, αφού η στην ενεργοποιημένη της μορφή συμβάλλει στην διόρθωση του DNA (DNA repair), στην παύση των κυτταρικών κύκλων και στην απόπτωση. Μεταλλάξεις της πρωτεΐνης p53 εμφανίζονται με συχνότητα της τάξεως πέραν του 50% σε πολλούς τύπους καρκίνων.

Η πρωτεΐνη Cyclin E είναι ρυθμιστική για τον κύκλο ζωής του κυττάρου, αφού ρυθμίζει την μετάβαση από τη φάση G1 στην φάση S του κύκλου ζωής κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού του κυττάρου. Σε πολλές περιπτώσεις καρκινικών κυττάρων υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυτής και η δραστηριότητά της είναι διαταραγμένη.

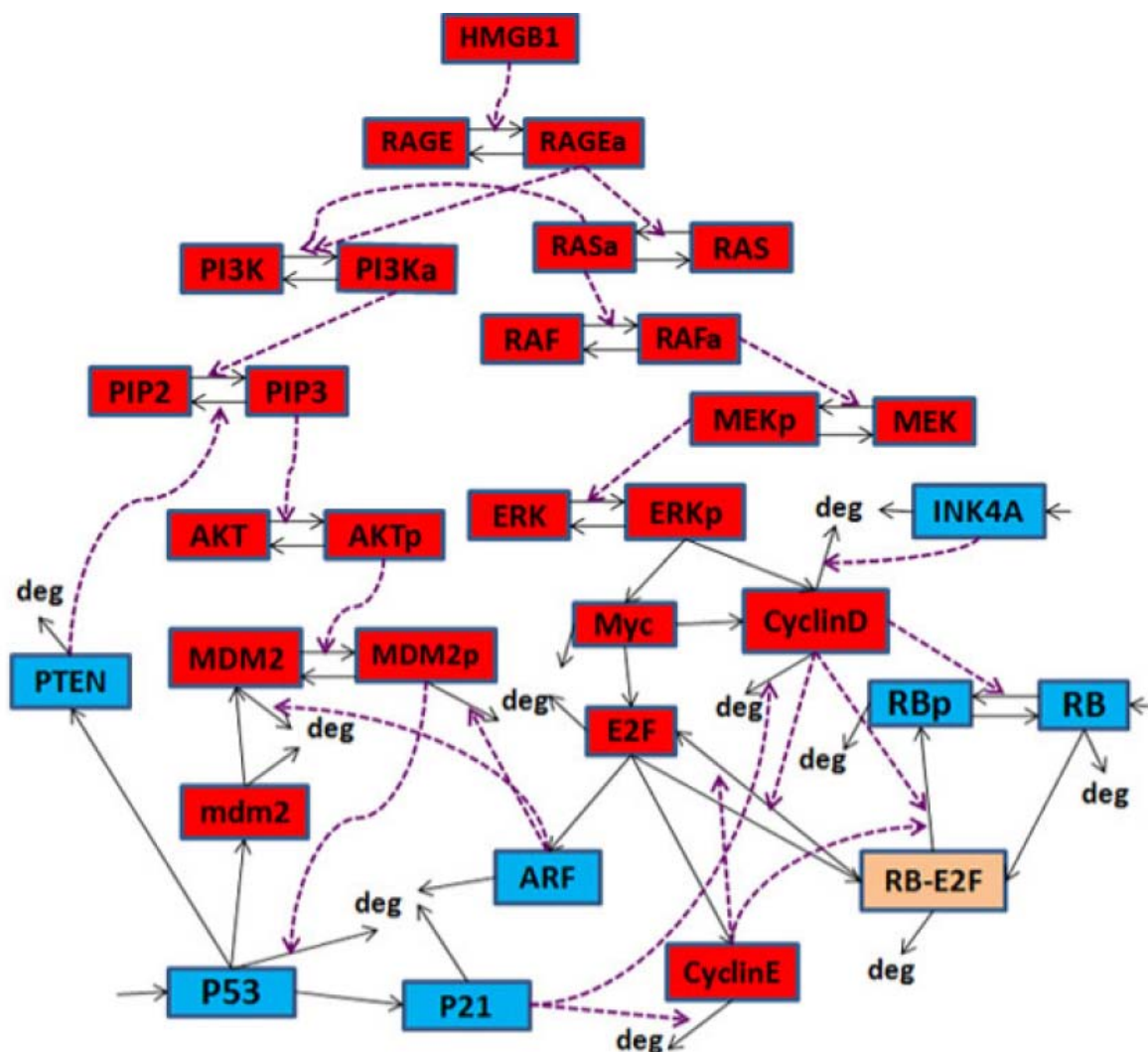
Υπάρχουν ενδείξεις από μελέτες ότι τα δυο σηματοδοτικά μονοπάτια στα οποία δρουν οι πρωτεΐνες p53 και Cyclin E μπορούν να αλληλεπιδράσουν και η ύπαρξη του ενός να επηρεάσει την ύπαρξη του άλλου. Αυτή η αλληλεπίδραση ρυθμίζεται από την ύπαρξη κάποιων άλλων ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών (ARF, p21 και FBXW7) οι οποίες παρουσιάζονται μεταλλαγμένες σε πολλά είδη καρκίνων.

Στην συνέχεια ακολουθεί περιγραφή του βιολογικού συστήματος που μοντελοποιήθηκε περιγράφοντας τα σηματοδοτικά μονοπάτια P53-MDM2, RAS-ERK και Rb-E2F που είναι άμεσα επηρεαζόμενα από την πρωτεΐνη HMGB1 και τα οποία περιλήφθηκαν στο μοντέλο.

5.2. Το βιολογικό σύστημα που μοντελοποιήθηκε

Στην εικόνα 5.2.1 [4] φαίνεται το σηματοδοτικό μονοπάτι της πρωτεΐνης HMGB1, το οποίο επηρεάζει την εξέλιξη τριών άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Συνολικά, υπάρχουν 31 είδη μορίων (πρωτεΐνες, λιπίδια και υποδοχείς) από τα οποία οι 6 είναι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες και 59 χημικές αντιδράσεις. Να σημειωθεί ότι στο βιολογικό σύστημα [4] που μοντελοποιήθηκε οι υποδοχείς RAGE αντικαθιστούν την ύπαρξη κάθε άλλου είδους

υποδοχέων με τους οποίους αντιδρά η HMGB1 εξαιτίας της περιορισμένης βιολογικής γνώσης που υπάρχει για το θέμα αυτό.



Εικόνα 4.2.1 [4]: Το σηματοδοτικό μονοπάτι της πρωτεΐνης HMGB1

5.2.1 Περιγραφή των σηματοδοτικών μονοπατιών

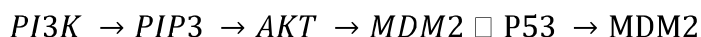
Παρακάτω δίνεται η περιγραφή (όπως αυτή παρουσιάζεται στο [4]) των τριών σηματοδοτικών μονοπατιών που επηρεάζονται από το σηματοδοτικό μονοπάτι της HMGB1 καθώς και η μεταξύ τους σχέση.

Συμβολίζουμε με $\rightarrow$ την ενεργοποίηση οντοτήτων και με $\square$ την καταστολή (*inhibition or repression*).

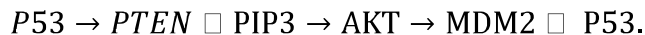
- **Σηματοδοτικό μονοπάτι P53-MDM2**

Το σηματοδοτικό μονοπάτι **P53 – MDM2** έχει ένα αρνητικό και ένα θετικό κύκλο ανατροφοδότησης (*negative/positive feed-back loop*).

Ο αρνητικός κύκλος ανατροφοδότησης είναι:



και ο θετικός είναι:



Η πρωτεΐνη PI3K ενεργοποιείται από τους toll-like receptors (TLR 2/4) αφότου περάσουν πολλά λεπτά από την ενεργοποίηση των TLR2/4 από την HMGB1.

Η πρωτεΐνη PI3K (αφού ενεργοποιηθεί), φωσφορυλιώνει το λιπίδιο *phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*(PIP2) στο *phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate* (PIP3) οδηγώντας επίσης στην φωσφορυλίωση της AKT.

Η ογκοπρωτεΐνη MDM2 (που είναι ένας από τους μεταγραφικούς στόχους της P53), μπορεί να υπάρξει μόνο μέσα στο κυτόπλασμα ενός κυττάρου και δεν μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα εφόσον δεν έχει φωσφορυλιωθεί από το ενεργό AKT. Εφόσον φωσφορυλιωθεί, η πρωτεΐνη MDM2 μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα και να αναπτύξει δεσμούς με την πρωτεΐνη P53. Κάτι τέτοιο θα αναστείλει (*inhibit*) την μεταγραφική δραστηριότητα (*transcriptional activity*) της πρωτεΐνης P53 και θα αρχικοποιήσει την πολυβουικουϊνωση της p53, γεγονός το οποίο θα την οδηγήσει σε υποβάθμιση (*degradation*).

Η πρωτεΐνη P53 μπορεί να ρυθμίσει την μεταγραφή (*transcription*) της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης PTEN η οποία υδρολύει το λιπίδιο PIP3 στο λιπίδιο PIP2 και ως εκ τούτου αναστέλλει την ενεργοποίηση των AKT και MDM2.

- **Σηματοδοτικό μονοπάτι RAS-ERK**

Σε αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι συμβαίνουν τα εξής:



Κατά την ενεργοποίηση της από την πρωτεΐνη HMGB1, η RAGE ενεργοποιεί τις πρωτεΐνες RAS, οι οποίες οδηγούν στην ενεργοποίηση της πρωτεΐνης RAF. Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη RAF φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες MEK (*mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKK)*), οδηγώντας επίσης στην φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης ERK1 & 2 (γνωστή και ως MAPKs). Η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη ERK μπορεί να φωσφορυλιώσει κάποιους μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούν την έκφραση(*expression*) των ρυθμιστικών πρωτεϊνών Cyclin D και Myc, οδηγώντας στην εξέλιξη του κύκλου ζωής του κυττάρου μέσα στη φάση G1. Η πρωτεΐνη K-RAS η οποία είναι μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών RAS, βρίσκεται μεταλλαγμένη σε περισσότερες από το 90% των περιπτώσεων καρκίνου στο πάγκρεας.

- **Σηματοδοτικό μονοπάτι Rb-E2F**

Αυτό το σηματοδοτικό μονοπάτι αποτελείται από τις εξής αλληλεπιδράσεις:



και είναι πολύ σημαντικό για την ρύθμιση της μετάβασης από την φάση G1 στην φάση S του κύκλου ζωής των κυττάρων κατά τον πολλαπλασιασμό τους. Η πρωτεΐνη E2F είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιεί την μεταγραφή πολλών πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην αναπαραγωγή του DNA (DNA replication) και στην εξέλιξη του κύκλου ζωής των κυττάρων. Στις περιπτώσεις των κυττάρων που είναι σε *ηρεμία*, η μεταγραφική δραστηριότητα της πρωτεΐνης E2 F καταστέλλεται μετά την ένωση της με την μη-φωσφορυλιωμένη ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη Rb όπου σχηματίζεται το σύμπλεγμα Rb-E2F.

Οι ογκοπρωτεΐνες Cyclin D και Myc μπορούν να φωσφορυλιώσουν την πρωτεΐνη Rb γεγονός το οποίο ενεργοποιεί και απελευθερώνει την πρωτεΐνη E2F. Ακολούθως, η E2F

οδηγεί στην μεταγραφή των πρωτεϊνών Cyclin E και Cyclin-dependent protein kinase 2 (CDK2), οι οποίες οδηγούν στην εξέλιξη του κύκλου ζωής του κυττάρου. Η πρωτεΐνη Cyclin E συνεχίζει να καταστέλλει την δραστηριότητα της πρωτεΐνης Rb οδηγώντας σε ένα θετικό κύκλο ανατροφοδότησης. Στην εικόνα 5.2.1 φαίνεται ότι η δραστηριότητα του Cyclin D-CDK4/6 (στην εικόνα Cyclin D) παρεμποδίζεται από την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη INK4A, η οποία είναι ανενεργή σε πέραν των 90% των περιπτώσεων καρκίνου στο πάγκρεας.

5.2.2 Αλληλεπίδραση μεταξύ των σηματοδοτικών μονοπατιών

Τα τρία σηματοδοτικά μονοπάτια που περιγράφηκαν πιο πάνω δεν είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους στο δίκτυο σηματοδοτικών μονοπατιών της πρωτεΐνης HMGB1. Συνεπώς, οποιαδήποτε επικοινωνία και αλληλεπίδραση συμβεί ανάμεσα τους μπορεί να επηρεάσει την μοίρα του κυττάρου. Όπως φαίνεται στην εικόνα 5.2.1, η ογκοπρωτεΐνη RAS μπορεί να ενεργοποιήσει το PI3K-AKT σηματοδοτικό μονοπάτι. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη ARF που προκαλείται από την E2F, μπορεί να ενωθεί με την MDM2, προκειμένου να προωθήσει την γρήγορη αποσύνθεση της (*degradation*) και να σταθεροποιήσει την P53. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί σε πειράματα, ότι οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες P21 και FBXW7 που είναι εξαρτημένες από την P53 μπορούν να αναστείλουν την δραστηριότητα των cyclin dependent kinases (Στην εικόνα χρησιμοποιείται η P21 για την αναπαράσταση των 2 πρωτεϊνών). Μεταλλάξεις των πρωτεϊνών RAS, ARF, P21 και FBXW7 έχουν βρεθεί σε πολλές περιπτώσεις καρκίνου. Ένας από τους σκοπούς των συγγραφέων είναι να ερευνήσουν πως αυτές οι μεταλλάξεις επηρεάζουν την μοίρα του κυττάρου.

5.3 Μοντελοποίηση βιολογικού συστήματος στην BlenX

Για την μοντελοποίηση του βιολογικού συστήματος χρησιμοποιήθηκε η άλγεβρα διεργασιών *BetaBinders* και το εργαλείο που την υποστηρίζει *BetaWorkbench* στην γλώσσα BlenX.

Σε αυτό το υποκεφάλαιο αναφέρονται κάποιες λεπτομέρειες της μοντελοποίησης αλλά και το σκεπτικό του τρόπου κατασκευής του μοντέλου.

5.3.1 Λεπτομέρειες μοντελοποίησης

1. Η συγκέντρωση των μορίων που χρησιμοποιήθηκε για τις προσομοιώσεις του μοντέλου είναι το πλήθος του κάθε μορίου, όπως αυτό δόθηκε στο αρχικό μοντέλο [4].
2. Η πιθανοτική τιμή για την σύνθεση των πρωτεϊνών στο μοντέλο καθορίζεται από την συνάρτηση *Hill* (*HillFunction*). Ο λόγος είναι ότι σε πολλές μελέτες προέκυψε ότι οι πιθανοτικές τιμές για μεταγραφή πρωτεϊνών ακολουθούν σιγμοειδής συναρτήσεις των συγκεντρώσεων των παραγόντων μεταγραφής (*transcriptionfactor*) των πρωτεϊνών με θετικούς συντελεστές *Hill*.
3. Η εξίσωση για την συνάρτηση *Hill* που εμπλέκει μόνο ένα μόριο είναι

$$Hill(k, K, n) = k * \frac{x1^n}{K^n + x1^n}$$

Όπου *K* είναι σταθερά *Hill*, *n* είναι συντελεστής *Hill* και *x1* είναι η συγκέντρωση του μορίου στην οποία αναφέρεται η συνάρτηση *Hill*. Για τις περιπτώσεις που η συνάρτηση *Hill* εμπλέκει δυο μόρια η πιο πάνω εξίσωση διαφοροποιείται, πολλαπλασιάζοντας την τιμή που προκύπτει από αυτήν με την συγκέντρωση του δεύτερου μορίου.

4. Οι πιθανοτικές τιμές για τις υπόλοιπες αντιδράσεις χρησιμοποιούν τους κανόνες *MassAction* (*MassActionRules*).

5.3.2. Κατασκευή μοντέλου

Το βιολογικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνει μονομοριακές και διμοριακές αντιδράσεις. Αυτές οι αντιδράσεις αφορούν επικοινωνία και αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων, εσωτερικές ενέργειες αλλά και σχηματισμό(*complex*) ή αποσύνθεση(*decomplex*) συμπλόκων ανάμεσα σε διαφορετικού είδους μόρια.

Σε αυτό το υποκεφάλαιο παρουσιάζεται το σκεπτικό του τρόπου μοντελοποίησης τέτοιων φαινομένων στην γλώσσα *BlenX*.

Γενικά, μια πρωτεΐνη μπορεί να βρίσκεται σε φωσφορυλιωμένη ή μη φωσφορυλιωμένη μορφή ή/και σε ενεργοποιημένη ή μη ενεργοποιημένη μορφή. Η μορφή στην οποία βρίσκεται μια πρωτεΐνη καθορίζει και τις δυνατότητες δράσης ή και αλληλεπίδρασης της με άλλες πρωτεΐνες. Έτσι, μια πρωτεΐνη στην φωσφορυλιωμένη της μορφή μπορεί να επικοινωνήσει με μια άλλη, ενώ κάτι τέτοιο είναι αδύνατον εάν η ίδια πρωτεΐνη είναι στην μη φωσφορυλιωμένη της μορφή.

Κάποιες από τις πρωτεΐνες του συστήματος ικανοποιούν την πιο πάνω ιδιότητα και για την μοντελοποίηση τους χρειάστηκε ο ορισμός δυο *κουτιών* για αυτές. Το ένα *κουτί* αφορά την μη φωσφορυλιωμένη/ενεργοποιημένη μορφή και το δεύτερο την φωσφορυλιωμένη/ενεργοποιημένη μορφή. Στην πρώτη περίπτωση το όνομα του κουτιού φέρει τον δείκτη “*u*” και στην δεύτερη τον δείκτη “*p*”. Για παράδειγμα, στο μοντέλο υπάρχουν δυο *κουτιά* που αφορούν την πρωτεΐνη PI3K: το ένα φέρει το όνομα “PI3Ku” για την μη ενεργοποιημένη μορφή και το άλλο το όνομα “PI3Kp” για την ενεργοποιημένη. Ο σχετικός κώδικας από το μοντέλο είναι:

*letPI3Ku: bproc = #(*x*,PI3Ku_type),#(*y*,PI3Kp_out_PIPu)[PI3K_process];*

*letPI3Kp: bproc = #(*x*,PI3Kp_type),#(*y*,PI3Kp_out_PIPu)[PI3K_process];*

Η λέξη κλειδί “*bproc*” υποδηλώνει τον ορισμό *κουτιού* και κάθε ζεύγος παρενθέσεων που ακολουθεί το σύμβολο “*#*” αφορά τον ορισμό ενός συνδέτη για το *κουτί*. Ανάμεσα στις τετράγωνες παρενθέσεις δηλώνεται η λειτουργία της οντότητας. Η συμπεριφορά της πρωτεΐνης PI3K είναι ορισμένη στην *διαδικασία* (*process*) “PI3K_process”.

letPI3K_process: pproc = ...

Η λέξη κλειδί “*pproc*” χρησιμοποιείται για τον ορισμό *διαδικασίας*.

Στην συνέχεια θα επεξηγηθεί η μοντελοποίηση βασικών συμπεριφορών μέσα από το παράδειγμα της ίδιας πρωτεΐνης PI3K. Τέτοιες βασικές συμπεριφορές που χρειάστηκε να μοντελοποιηθούν είναι η φωσφορυλίωση μιας πρωτεΐνης καθώς και η αναίρεση της ενέργειας αυτής, η αποστολή και η λήψη σήματος καταστολής μιας πρωτεΐνης με αποτέλεσμα την εξαφάνιση της, η αυτοαποσύνθεση και η σύνθεση μιας πρωτεΐνης.

Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνηPI3Kμπορεί να φωσφορυλιωθεί λαμβάνοντας σήμα από την ενεργοποιημένη RAGEκαι να αποφωσφορυλιωθεί εκτελώντας μια εσωτερική ενέργεια με πιθανοτική τιμήd2. Επίσης, αφού φωσφορυλιωθεί η πρωτεΐνηPI3Kμπορεί να στείλει σήμα φωσφορυλίωσης στο λιπίδιο PIP2.

Η πιο πάνω συμπεριφορά μοντελοποιείται στον πιο κάτω κώδικα:

```

let phosphorilation_dephosphorilation_PI3K: pproc=
  if (x,PI3Ku_type) then x?().ch(x,PI3Kp_type).unhide(y).rec1!().nil endif      +
  if (x,PI3Kp_type) then ch(rate(d2),x,PI3Ku_type).hide(y).rec1!().nil endif    ;

letsend_phosphorilation_signal_to_PIPu:pproc=
  if (x,PI3Kp_type) then y!().rec2!().nil endif;

letPI3K_process: pproc = phosphorilation_dephosphorilation_PI3K/
rep rec1?().phosphorilation_dephosphorilation_PI3K/
send_phosphorilation_signal_to_PIPu |
rep rec2?().send_phosphorilation_signal_to_PIPu;

letPI3Ku: bproc =#(x,PI3Ku_type),#h(y,PI3Kp_out_PIPu)[PI3K_process];

letPI3Kp: bproc =#(x,PI3Kp_type),#(y,PI3Kp_out_PIPu)[PI3K_process];

```

Η διεργασία *PI3K_process* περιλαμβάνει την παράλληλη σύνθεση τεσσάρων υποδιεργασιών. Από αυτές οι δυο είναι συμπληρωματικές προς τις άλλες δυο και απαραίτητες για την επίτευξη της συμπεριφοράς που θέλουμε. Η υπο διεργασία “*phosphorilation_dephosphorilation_PI3K*” μοντελοποιεί το θέμα φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης κάνοντας χρήση των εντολών *ifthen*. Ο έλεγχος των εντολών *ifthen* γίνεται στον τύπο του πρώτου συνδέτη των κουτιών, ο οποίος προσδίδει την μορφή στην οποία βρίσκεται το εκάστοτε *κουτί*. Έτσι, ο τύπος “PI3Ku_type” χρησιμοποιείται για να δηλώσει την μη φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνηςPI3K και ο τύπος “PI3Kp_type” χρησιμοποιείται για να δηλώσει την φωσφορυλιωμένη της μορφή.

Εάν ο συνδέτης είναι τύπου PI3Ku_type τότε μπορεί να δεχθεί ως είσοδο σήμα στον συνδέτη με υποκειμένοχ. Ακολούθως θα αλλάζει τον τύπο του συνδέτη σε “PI3Kp_type” αφού πλέον το εν λόγω κουτί αφορά την φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης, και θα ενεργοποιήσει τον δεύτερο συνδέτη με υποκειμένο γ εκτελώντας την ενέργεια *unhide*. Τέλος, θα πραγματοποιηθεί εσωτερική ενέργεια πάνω στο κανάλι *rec1*, προκειμένου ο κώδικας της διεργασίας να έρθει στην αρχική του μορφή (χρήση του τελεστή *rep*). Ο τελεστής *rep* χρησιμοποιεί στην αναπαραγωγή του κώδικα της διεργασίας, δυνατότητα η οποία είναι πολύ χρήσιμη στο BetaWorkbench. Μετά την εκτέλεση των ενεργειών και των μεταβολών που μόλις περιγράφηκαν, το κουτί παύει να ανήκει στην κατηγορία των κουτιών με όνομα PI3Ku με αποτέλεσμα η συγκέντρωση των κουτιών PI3Ku να μειωθεί κατά 1. Το νέο-διαμορφωμένο κουτί ταυτίζεται πλέον με τον ορισμό των κουτιών PI3Kp. Έτσι, στο σύστημα η συγκέντρωση των PI3Kp αυξάνεται κατά 1.

Εάν ο συνδέτης είναι τύπου PI3Kp_type τότε το κουτί μπορεί να εκτελέσει εσωτερική ενέργεια με πιθανοτική τιμή *d2*, αλλάζοντας τον τύπο του συνδέτη από PI3Kp_type σε PI3Ku_type. Ακολούθως, απενεργοποιείται ο δεύτερος συνδέτης και το κουτί προβαίνει σε εσωτερική ενέργεια πάνω στο κανάλι *rec1* με εξήγηση όπως αυτή που δόθηκε πιο πάνω.

Στη διεργασία PI3K_process περιλαμβάνεται επίσης η υποδιεργασία *send_phosphorylation_signal_to_PIPu* η οποία μοντελοποιεί την αποστολή μηνύματος φωσφορυλίωσης στην μη-φωσφορυλιωμένη μορφή του λιπιδίου PIPu. Η διεργασία αυτή ελέγχει κατά πόσο το κουτί της PIP3K αφορά την φωσφορυλιωμένη μορφή της και προβαίνει σε αποστολή σήματος μέσω του συνδέτη με υποκειμένο γ και τύπο PI3Kp_out_PIPu. Η πιθανοτική τιμή για την εκτέλεση της εν λόγω ενέργειας είναι δηλωμένη στο αρχείο “.types” σε μια πλειάδα που συνδέει την αλληλεπίδραση του τύπου PI3Kp_out_PIPu με τον ανάλογο τύπο στο κουτί του λιπιδίου PIPu.

Η σύνθεση πρωτεϊνών μοντελοποιήθηκε κάνοντας χρήση των *events* στην BlenX. Για παράδειγμα, η φωσφορυλιωμένη μορφή της πρωτεΐνης ERK συνθέτει τις πρωτεΐνες Myc και CyclinD με πιθανοτικές τιμές που δίνονται αντίστοιχα από τις συναρτήσεις *fhill4* και *fhill5*. Στο μοντέλο μας περιλαμβάνουμε τις πιο κάτω γραμμές κώδικα για να μοντελοποιήσουμε αυτήν την συμπεριφορά.

when (ERKp::fhill4) split(ERKp,Myc);

when (ERKp::fhill5) split(ERKp,CD);

Η ενέργεια splitέχει σαν αποτέλεσμα να αντικαταστήσει μια εμφάνιση της οντότητας που βρίσκεται στην παρένθεση (εδώ ERKp) με δυο άλλες οντότητες. Στο παράδειγμά μας, θέλουμε η ERKp να συνεχίσει να υφίσταται μετά την σύνθεση των άλλων πρωτεϊνών. Γι' αυτό την περιλαμβάνουμε στην παρένθεση της ενέργειας split.

Η δημιουργία συμπλόκων αλλά και η διάσπαση τους μοντελοποιήθηκαν και πάλι με την χρήση eventsστην BlenX. Το βιολογικό σύστημα περιλαμβάνει σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ της πρωτεΐνης E2F και της μη φωσφορυλιωμένης RB μετά από μεταξύ τους αλληλεπίδραση με *πιθανοτική τιμή* α_7 . Στο μοντέλο η συμπεριφορά αυτή μοντελοποιήθηκε αντικαθιστώντας την ύπαρξη ενός κουτιού E2F και ενός κουτιού RB με ένα άλλο κουτί, στιγμιότυπο του κουτιού RE. Ο σχετικός κώδικας παρουσιάζεται πιο κάτω.

when (E2F,RB::rate(α_7)) join(RE);

Για την διάσπαση του συμπλόκου RE, ορίστηκε ένα άλλο κουτί με όνομα RE_decomplex. Όταν πρέπει να διασπαστεί ένα στιγμιότυπο του συμπλόκου RE αυτό μετατρέπεται σε στιγμιότυπο του κουτιού RE_decomplex το οποίο σύμφωνα με το πιο κάτω event προκαλεί την άμεση (η *πιθανοτική τιμή* είναι *inf*) αντικατάσταση του με δυο άλλες οντότητες (E2F και RBp).

when (RE_decomplex::inf) split(E2F,RBp);

Τέλος, ο πραγματικός χρόνος των πειραμάτων στο εργαστήριο, μοντελοποιήθηκε με την εκτέλεση βημάτων κατά την προσομοίωση. Περισσότερα για αυτό το θέμα υπάρχουν στο κεφάλαιο 6 όπου παρουσιάζονται τα πειράματα.

Ο κώδικας του μοντέλου βρίσκεται ολοκληρωμένος στο Παράρτημα Α.

Κεφάλαιο 6

Διεξαγωγή Πειραμάτων και Αποτελέσματα

6.1. Πείραμα 1: Προσομοίωση μοντέλου	58
6.2. Πείραμα 2: Μεταβολή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών HMGB1 και AKT	61
6.3. Πείραμα 3: Μεταλλαγμένες πρωτεΐνες	66

Στόχος μας ήταν εξ' αρχής να μελετήσουμε την συμπεριφορά του σηματοδοτικού μονοπατιού της πρωτεΐνης HMGB1 [4]. Αφού δημιουργήθηκε το μοντέλο, πραγματοποιήθηκε μια σειρά από πειράματα τα οποία έδειξαν κάποιες σημαντικές συμπεριφορές που συνάδουν με τις πραγματικές. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν πειράματα τα οποία δείχνουν ποια πιθανόν να είναι η συμπεριφορά των πρωτεϊνών υπό κάποιες συνθήκες οι οποίες δεν έχουν ακόμη μελετηθεί στο εργαστήριο.

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ο προσομοιωτής του BetaWorkBench (BetaWorkBenchsimulatorversion 4.1) και τα αποτελέσματα έτυχαν επεξεργασίας από τον BetaWorkBenchPlotter και την MicrosoftExcel 2010.

Υπολογιστικά, 24 ώρες πραγματικού χρόνου στο εργαστήριο μεταφράζονται με 1500 βήματα εκτέλεσης μη άμεσων ενεργειών, όπου μια ενέργεια χαρακτηρίζεται ως άμεση όταν η πιθανοτική τιμή της προς εκτέλεση είναι ∞ . Κάθε βήμα εκτέλεσης προσομοιώνει 1 λεπτό

πραγματικού χρόνου, σύμφωνα με τους ίδιους τους συγγραφείς του άρθρου [4]. Έτσι, αφού 24 ώρες αντιστοιχούν σε 1440 λεπτά, ο χρόνος προσομοίωσης τέθηκε στα 1500 βήματα εκτέλεσης. Να σημειωθεί ότι θα μπορούσε ο χρόνος προσομοίωσης να τεθεί ως παράμετρος χρόνου (simulationtime) αντί βήματα εκτέλεσης. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος δεν ήταν καθόλου πρακτική για ευνόητους λόγους. Τα αποτελέσματα ήταν αρχεία μεγέθους πέραν των 7GB και ο χρόνος ολοκλήρωσης των εκτελέσεων ξεπερνούσε τα 25 λεπτά πραγματικού χρόνου. Το πρακτικό αυτό πρόβλημα λύθηκε με τον τρόπο που περιγράφηκε πιο πάνω (κάνοντας χρήση βημάτων εκτέλεσης) σε συνδυασμό με μια παράμετρο *delta* της οποίας η τιμή τέθηκε σε 1. Η τιμή της παραμέτρου *delta* εκφράζει το πόσο συχνά είναι επιθυμητό να καταγράφονται οι συγκεντρώσεις των μορίων στο αρχείο αποτελεσμάτων. Συνεπώς, με την τιμή 1 δηλώνεται η απαίτηση καταγραφής των συγκεντρώσεων σε κάθε ένα βήμα εκτέλεσης μη άμεσης ενέργειας.

Αρχικά, θέσαμε την συγκέντρωση της πρωτεΐνης HMGB1 σε 10^3 μόρια. Στον πίνακα 6.1 φαίνονται οι αρχικές συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών στο μοντέλο. Οι πρωτεΐνες που δεν εμφανίζονται στον πίνακα έχουν αρχική συγκέντρωση 0.

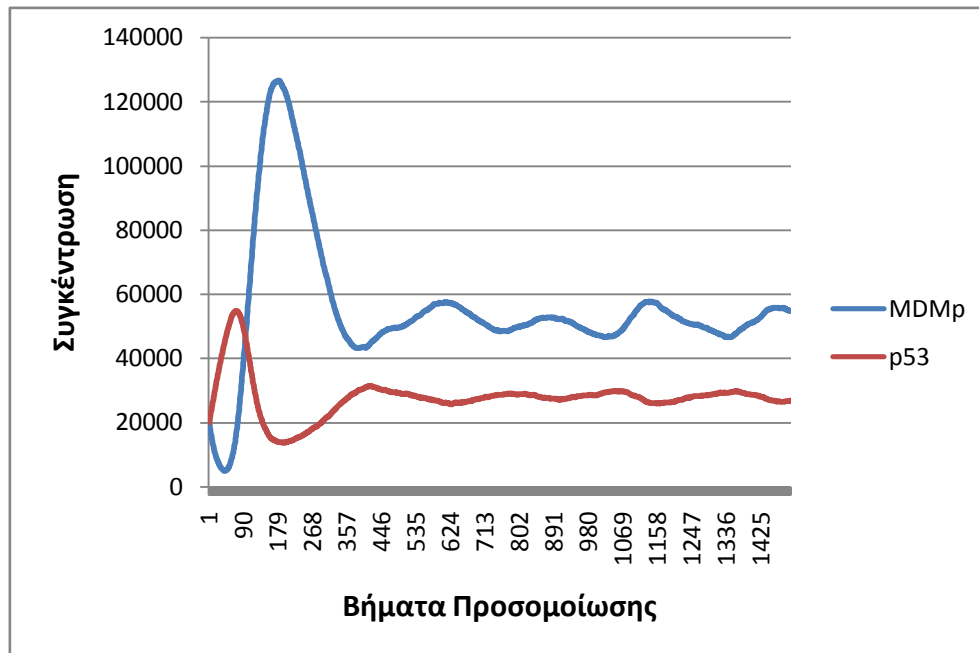
Σε αυτό το σημείο να σημειωθεί ότι οι πιθανοτικές τιμές που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή του μοντέλου ήταν αυτές που υπήρχαν διαθέσιμες από τους συγγραφείς του άρθρου στο οποίο στηρίχτηκε η παρούσα διπλωματική εργασία [4]. Ωστόσο, οι πιθανοτικές τιμές που υπήρχαν διαθέσιμες δεν είναι βέβαιο ότι ανταποκρίνονται στις σωστές τιμές όπως πληροφορηθήκαμε από έναν από τους συγγραφείς. Συνεπώς, αναμένουμε κάποιες διαφορές στα αποτελέσματα μας σε σύγκριση με τα αποτελέσματα του άρθρου, διαφορές οι οποίες δεν θα οφείλονται αποκλειστικά στην στοχαστικότητα.

Πίνακας 6.1: Οι αρχικές συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών

HMGB1	RAGE	PI3K	PIP2	AKT	MDM2	MDM2p	P53	RAS	RAF	MEK	ER K	RE
10^3	10^3	10^5	10^5	10^5	10^4	2×10^4	2×10^4	10^4	10^4	10^4	10^4	10^5

6.1. Πείραμα 1: Προσομοίωση του μοντέλου

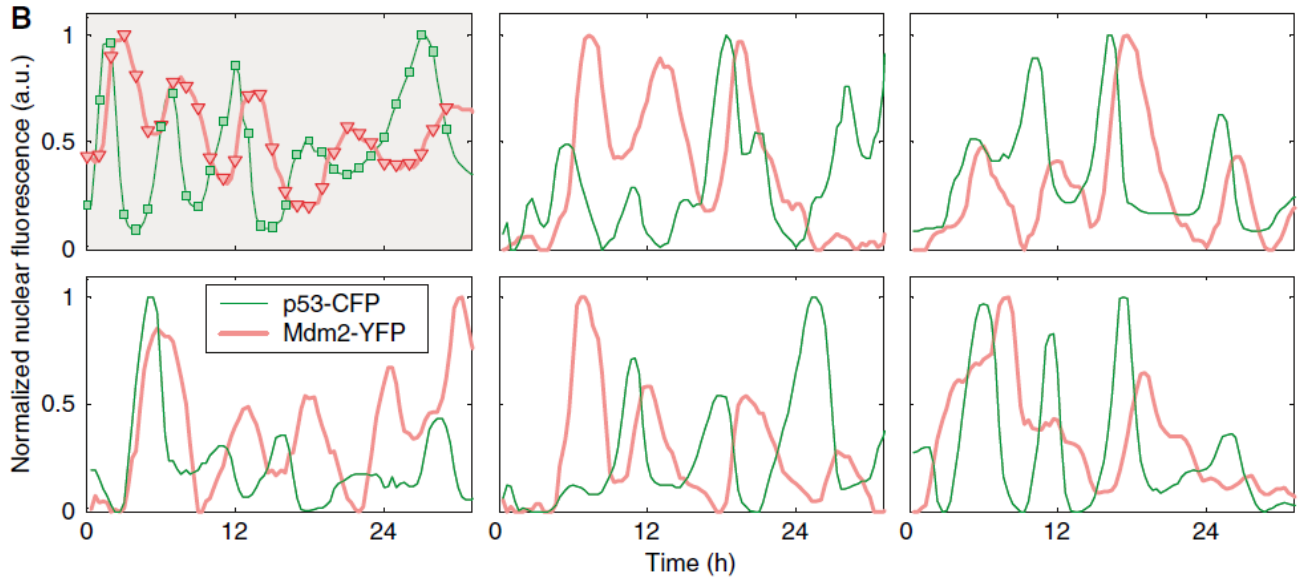
Σε αυτό το πείραμα προσομοιώνουμε το μοντέλο μας χρησιμοποιώντας τις συγκεντρώσεις των μορίων που φαίνονται στον πίνακα 6.1. Τα αποτελέσματα του πειράματος φαίνονται στις εικόνες 6.1.1 και 6.1.3.



Εικόνα 6.1.1: Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών P53 και MDM2p μέσα σε 24 ώρες προσομοίωσης.

Η γραφική παράσταση της εικόνας 6.1.1 δείχνει τα επίπεδα συγκέντρωσης των πρωτεϊνών P53 και MDM2p για διάστημα 24 ωρών προσομοίωσης. Από την Βιολογία είναι γνωστό ότι ένα κύτταρο παραμένει στην φάση G1 για τουλάχιστον 10 ώρες προτού εισέλθει στην φάση S όπου διπλασιάζει το γενετικό υλικό. Παρατηρούμε ότι οι δυο πρωτεΐνες μετά από πάροδο 10 ωρών όπου το κύτταρο εισέρχεται στην φάση S (γύρω στο 600^ο βήμα εκτέλεσης) αυξομειώνονται. Αυτή η συμπεριφορά συνάδει με τα αποτελέσματα πειραμάτων [28] που έχουν γίνει σε καρκινικά κύτταρα του μαστού και φαίνονται στην εικόνα 6.1.2. Στα εν λόγω πειράματα είχε παρατηρηθεί ότι η μεταβολή των πρωτεϊνών P53

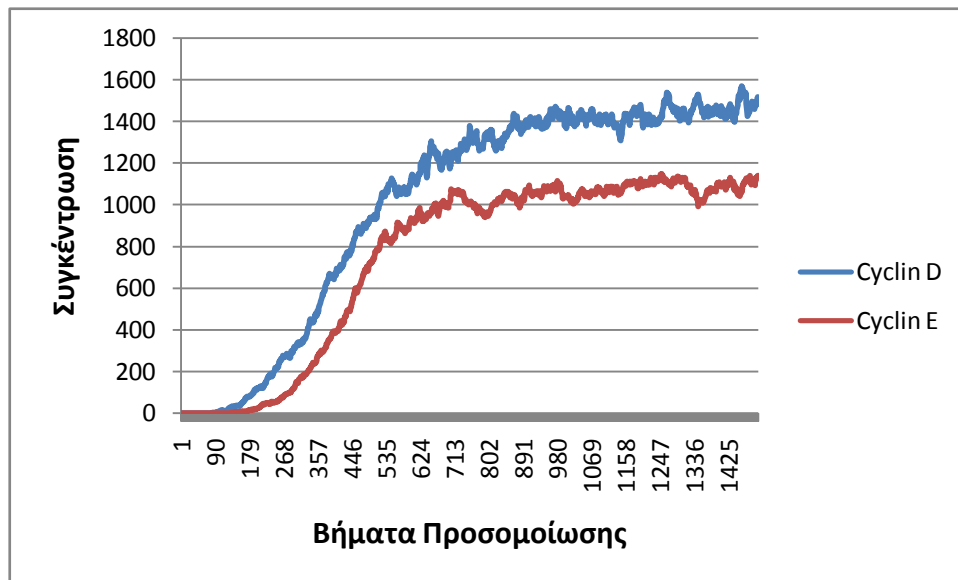
και MDM2p σε καταστραμμένα από γ-ακτινοβολία κύτταρα αυξομειώνεται ακόμα και μετά από 72 ώρες μετά την ακτινοβολία.



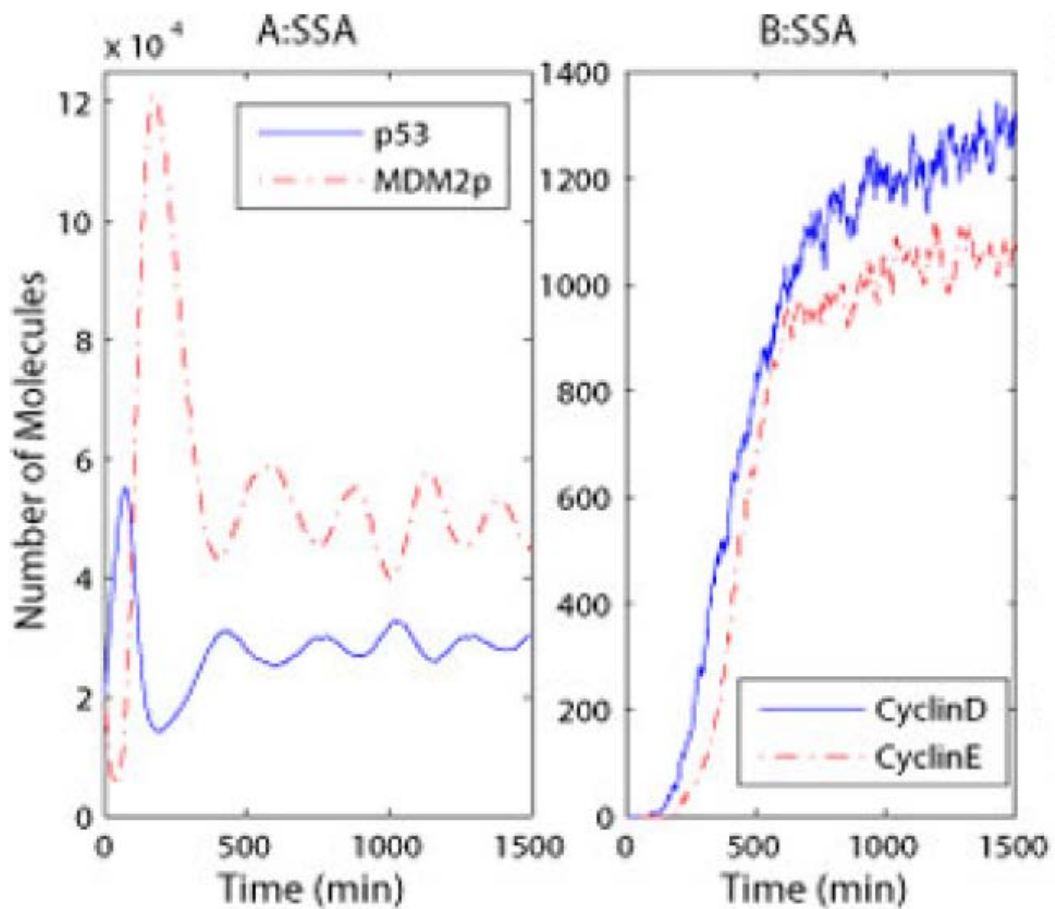
Εικόνα 6.1.2 [28]: Τα πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης των πρωτεϊνών p53 και MDM2 μετά απο έκθεση κυττάρων σε γ-ακτινοβολία στο εργαστήριο. Πάνω αριστερά: τα αποτελέσματα από κάποια συγκεκριμένη οθόνη(panel A). Υπόλοιπες εικόνες: Γραφικές παραστάσεις για πέντε διαφορετικά κύτταρα τα οποία έχουν υποβληθεί σε γ-ακτινοβολία. Όταν το γενετικό υλικό είναι κατεστραμένο, υπάρχουν ταλαντώσεις στην συγκέντρωση των πρωτεϊνών p53 και MDM2.

Η σύγκριση μεταξύ των εικόνων 6.1.1 και 6.1.2 δεν μπορεί να είναι παρά μόνο ποιοτική. Αυτό που μας ενδιαφέρει είναι η συμπεριφορά των πρωτεϊνών p53 και MDM2 να είναι παρόμοια με τα *in vitro* αποτελέσματα. Δηλαδή, η παρατήρηση αυξομειώσεων μεταξύ των δυο πρωτεϊνών.

Η γραφική παράσταση της εικόνας 6.1.3 δείχνει ότι η πρωτεΐνη CyclinE φτάνει στην μέγιστη συγκέντρωση της μετά από 10 ώρες προσομοίωσης. Η CyclinE έχει σημαντικό ρόλο και ρυθμίζει τη μετάβαση του κυττάρου από την φάση G1 στην S, γι'αυτό και η αυξημένη συγκέντρωσή της μετά τις 10 ώρες προσομοίωσης είναι αναμενόμενη.



Εικόνα 6.1.3: Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης των κυκλινών D και E μέσα σε 24 ώρες προσομοίωσης. Μετά το τέλος του σταδίου G1 (600ο βήμα εκτέλεσης) παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση επειδή χρειάζεται για την προαγωγή του κύκλου στο στάδιο S.



Εικόνα 6.1.4 [4]: Συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών p53, MDM2p, CyclinD και CyclinE σε διάρκεια 24 ωρών προσομοίωσης

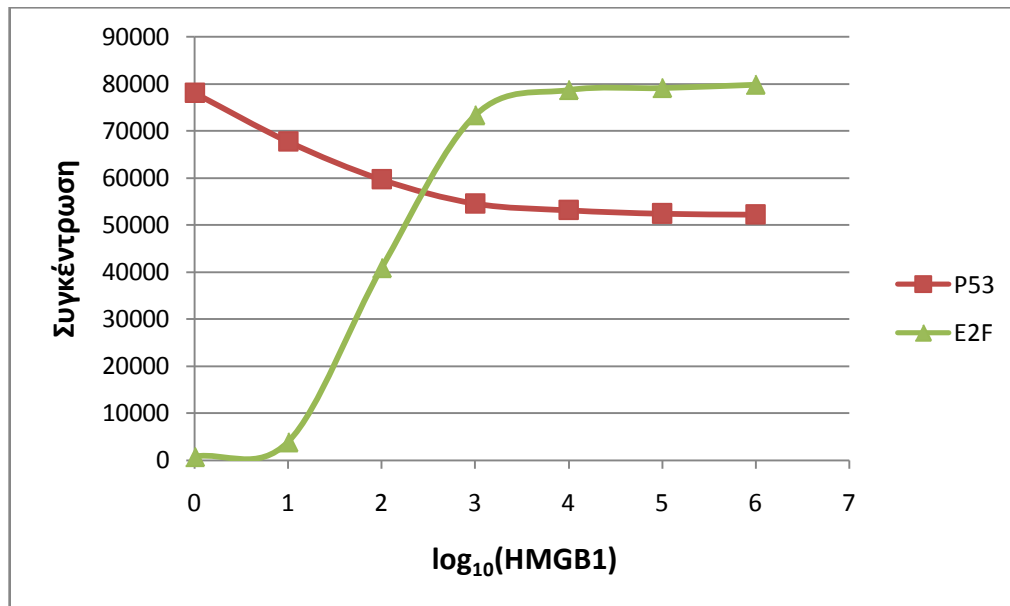
Η εικόνα 6.1.4 παρουσιάζει τα αποτελέσματα της αντίστοιχης προσομοίωσης από το άρθρο [4]. Στα αριστερά, φαίνεται η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών p53 και MDM2 ως προς τον χρόνο, στην οποία παρατηρούνται αυξομειώσεις μετά τις 10 ώρες προσομοίωσης (600^ο λεπτό). Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ παρόμοια με τα αποτελέσματα της εικόνας 6.1.1 τα οποία αφορούν την προσομοίωση του μοντέλου που φτιάχτηκε για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας. Η γραφική παράσταση που βρίσκεται στα δεξιά παρουσιάζει την συγκέντρωση των Κυκλινών D και E σχέση με τον χρόνο όπως αυτή παρουσιάζεται στο [4]. Τα αποτελέσματα αυτά ταυτίζονται με αποτελέσματα της εικόνας 6.1.3.

6.2. Πείραμα 2: Μεταβολή της συγκέντρωσης των HMGB1 και AKT

Από πολλές έρευνες που έχουν γίνει έχει παρατηρηθεί ότι η πρωτεΐνη HMGB1 παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα συγκέντρωσης στα καρκινικά κύτταρα. Η αυξημένη συγκέντρωση της πρωτεΐνης αυτής αλλά και των υποδοχέων της μπορούν να οδηγήσουν στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων αντί στην απόπτωση τους. Σκοπός αυτού του πειράματος είναι να μελετηθεί το πώς επηρεάζεται ο κύκλος ζωής του κυττάρου από τα επίπεδα συγκέντρωσης της HMGB1 αλλά και κάποιων άλλων πρωτεϊνών όπως είναι η AKT.

Στην πρώτη φάση του πειράματος αυτού πραγματοποιήθηκαν προσομοιώσεις του μοντέλου με διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης HMGB1. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η συμπεριφορά των πρωτεϊνών p53, E2F, CyclinD και CyclinE για συγκεντρώσεις $1, 10^1 \dots 10^6$ της πρωτεΐνης HMGB1. Η αρχική συγκέντρωση των πρωτεϊνών είναι αυτή που παρουσιάζεται στον πίνακα 6.1 και το μοντέλο προσομοιώθηκε 5 φορές για κάθε τιμή συγκέντρωσης της HMGB1. Τα αποτελέσματα που φαίνονται στις εικόνες 6.2.1 και 6.2.2 αφορούν μέσους όρους στις συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών και από τις 5 προσομοιώσεις. Για την πρωτεΐνη p53 καταγράφουμε την μέγιστη τιμή συγκέντρωσης που φτάνει καθ' όλη την διάρκεια της φάσης G1 (≈ 10 ώρες προσομοίωσης που

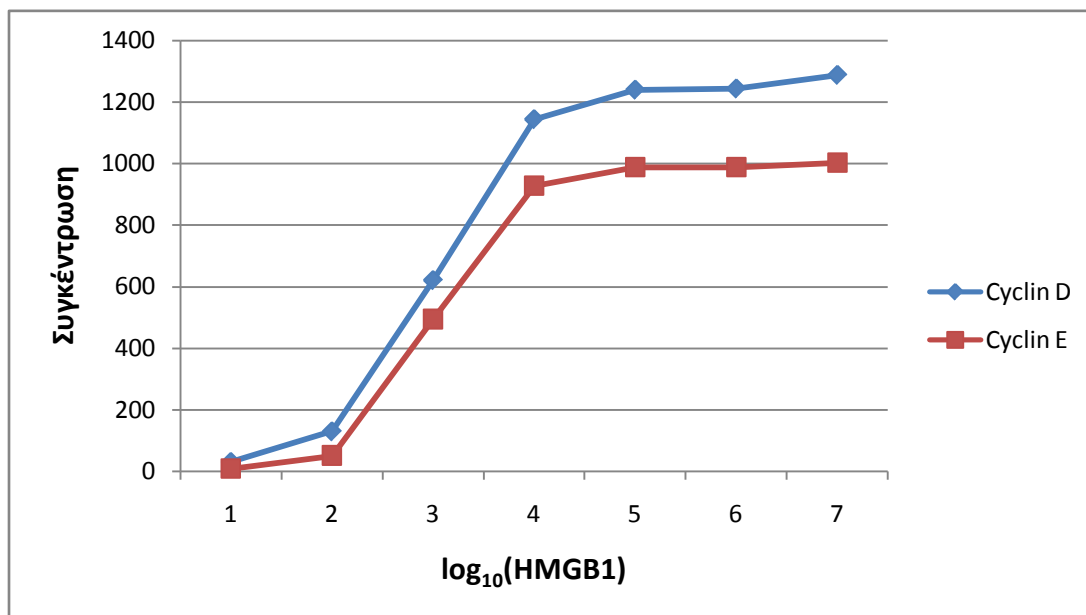
αντιστοιχούν σε 600 βήματα εκτέλεσης). Για τα E2F, CyclinD και CyclinE μετράμε την συγκέντρωση στο τέλος της φάσης G1, δηλαδή στο χρονικό σημείο μετάβασης από την G1 στην S (μετά από ≈ 10 ώρες προσομοίωσης).



Εικόνα 6.2.1: Γραφική παράσταση των μορίων P53 και E2F ως προς την πρωτεΐνη HMGB1. Η υπερσυγκέντρωση της HMGB1 οδηγεί στην αύξηση της E2F και την μείωση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης P53 οδηγώντας πολύ πιθανόν σε καρκινογένεση.

Από την γραφική παράσταση της εικόνας 6.2.1 βλέπουμε ότι καθώς η πρωτεΐνη HMGB1 αυξάνεται, προκαλείται μείωση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης P53. Η μείωση αυτή σταθεροποιείται περίπου μετά από την συγκέντρωση 10^5 μορίων της HMGB1 και αυτό συμβαίνει για το λόγο ότι η HMGB1 ενεργοποιεί και αυξάνει την συγκέντρωση της ογκοπρωτεΐνης E2F, γεγονός το οποίο ενεργοποιεί την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη ARF. Η ARF θα καταστείλει τη σειρά της τις πρωτεΐνες MDM2 προκειμένου να επέλθει ισορροπία στην συγκέντρωση της p53. Μελέτες έχουν δείξει ότι η πρωτεΐνη ARF παρουσιάζεται μεταλλαγμένη σε περισσότερες από το 80% των περιπτώσεων του καρκίνου στο πάγκρεας, με αποτέλεσμα την αλλοίωση στην δράση της που οδηγεί

στην μη επαρκή καταστολή των πρωτεϊνών MDM2 και συνεπώς στην περεταίρω μείωση της συγκέντρωσης της πολύτιμης για τον οργανισμό ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης P53.



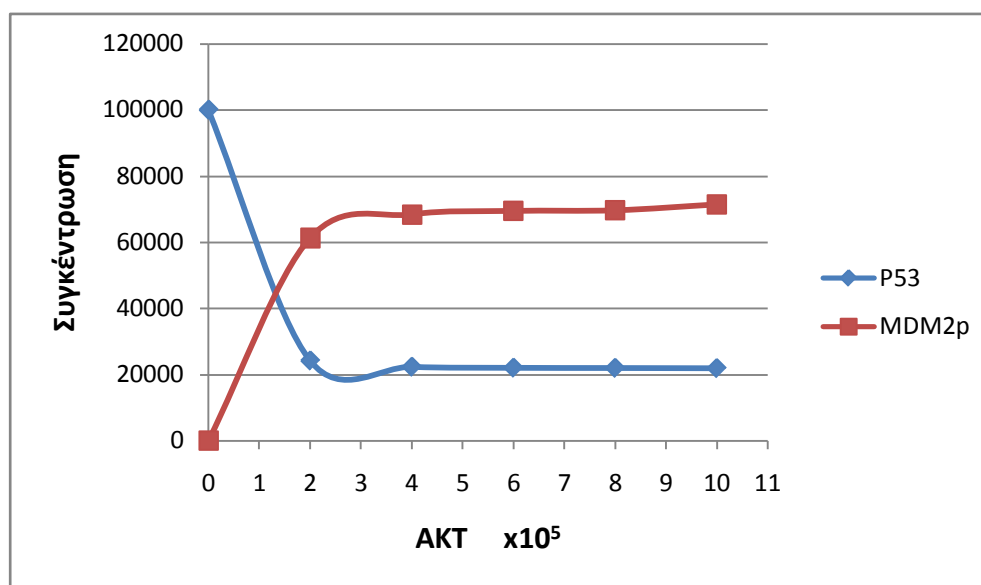
Εικόνα 6.2.2: Γραφική παράσταση των μρίων CyclinD και CyclinE ως προς την πρωτεΐνη HMGB1. Η υπερσυγκέντρωση της HMGB1 οδηγεί στην αύξηση των πρωτεϊνών CyclinE και D προωθώντας το κύτταρο σε διπλασιασμό του γενετικού υλικού του

Η εικόνα 6.2.2 παρουσιάζει συμπεριφορά η οποία δεν έχει ακόμη μελετηθεί *invitro*. Ωστόσο, μελλοντικά πειράματα μπορούν να την επιβεβαιώσουν. Αυτό που παρουσιάζει είναι το ότι η υπερσυγκέντρωση της HMGB1 οδηγεί στην αύξηση των ρυθμιστικών για το κύκλο ζωής του κυττάρου πρωτεϊνών CyclinD και E. Κάτι τέτοιο θα οδηγήσει τον κύκλο ζωής του κυττάρου στο στάδιο Σπροάγοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Οι γραφικές παραστάσεις στις εικόνες 6.2.1 και 6.2.2 επεξηγούν την πειραματική ανακάλυψη ότι η υπερσυγκέντρωση της πρωτεΐνης HMGB1 μειώνει την απόπτωση και προάγει τον διπλασιασμό του γενετικού υλικού (DNA replication) οδηγώντας στον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

Στην δεύτερη φάση του πειράματος κρατήθηκε σταθερή η συγκέντρωση της πρωτεΐνης HMGB1 στα 10^3 μόρια και προσομοιώθηκε η συμπεριφορά του μοντέλου με

διαφορετικές συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης AKT. Συγκεκριμένα, προσομοιώσαμε το μοντέλο για συγκέντρωση $0 \cdot 10^5, 2 \cdot 10^5, 4 \cdot 10^5, \dots, 10 \cdot 10^5$ μόρια της πρωτεΐνης AKT και επαναλάβουμε το πείραμα για κάθε συγκέντρωση 5 φορές. Οι τιμές που φαίνονται στην γραφική παράσταση της εικόνας 6.2.3 δείχνουν τους μέσους όρους των αποτελεσμάτων από τις 5 επαναλήψεις.



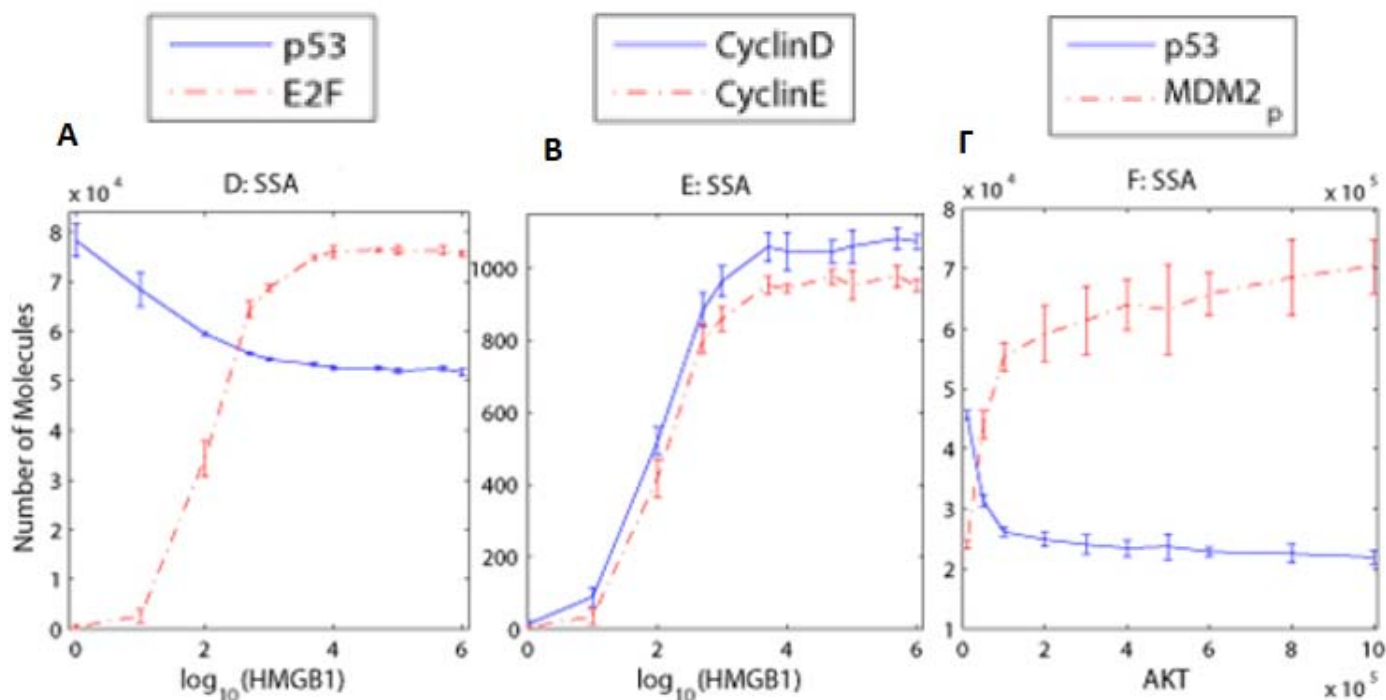
Εικόνα 6.2.3: Γραφική παράσταση των πρωτεϊνών P53 και MDM2p ως προς την πρωτεΐνη AKT. Η υπερσυγκέντρωση της HMGB1 οδηγεί στην ενεργοποίηση της AKT, η οποία προκαλεί αύξηση στη συγκέντρωση της P53 και στην μείωση της MDM2p

Η πρωτεΐνη AKT παρουσιάζει μεγάλα επίπεδα συγκέντρωσης σε πολλές μορφές καρκίνου. Τα αποτελέσματα της δεύτερης φάσης του πειράματος (εικόνα 6.2.3) δείχνουν ότι υπερσυγκέντρωση της AKT στον οργανισμό επάγει την μείωση της πρωτεΐνης P53 που είναι ογκοκατασταλτική, ενώ προωθεί την αύξηση της MDM2p. Αυτό συμβαίνει επειδή οι πρωτεΐνες AKT, ενεργοποιούν και φωσφορυλιώνουν τις πρωτεΐνες MDM2 οι οποίες βουικουιτώνουν τις P53 προκαλώντας την καταστολή τους.

Τα αποτελέσματα της εικόνας 6.2.3 προτείνουν ένα έμμεσο τρόπο για μείωση του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων με επαγωγή της απόπτωσης τους. Ο τρόπος αυτός εισηγείται την αποτροπή ενεργοποίησης ογκοπρωτεϊνών (όπως είναι η MDM2) στα σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζει η AKT μέσω της καταστολής της ίδιας της AKT

με την δράση κάποιων ειδικών φαρμάκων.

Η εικόνα 6.2.4 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των αντίστοιχων πειραμάτων από το άρθρο [4]. Οι συγκεντρώσεις των υπό μελέτη μορίων είναι περίπου ίδιες με αυτές που πήραμε από τις δικές μας προσομοιώσεις και οι οποίες παρουσιάστηκαν στις εικόνες πιο πάνω.



Εικόνα 6.2.4: Α-Β: Οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών p53, E2F, CyclinD και CyclinE ως προς την μεταβολή των συγκεντρώσεων της πρωτεΐνης HMGB1. Γ: Η συγκέντρωση των p53 και MDM2p ως προς την μεταβολή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης AKT.

Οι μικροδιαφορές που υπάρχουν οφείλονται στην στοχαστικότητα που διέπει τις προσομοιώσεις αλλά και στο γεγο ὅς ὅτι κάποιες από τις πιθανοτικές τιμές που χρησιμοποιήθηκαν δεν είναι ίδιες με αυτές που εφαρμόστηκαν για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων της εικόνας αυτής. Ωστόσο, αυτό που μας ενδιαφέρει είναι η γενική τάση των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών, η οποία ταυτίζεται.

6.3. Πείραμα 3: Μεταλλαγμένες πρωτεΐνες

Με αυτό το πείραμα επιδιώκεται η κατανόηση του πώς μεταλλαγμένες πρωτεΐνες επηρεάζουν την μοίρα του κυττάρου. Συγκεκριμένα, θα μελετηθούν οι πρωτεΐνες K-RAS, ARF και P21 οι οποίες είτε έχουν βρεθεί μεταλλαγμένες είτε παρατηρείται αδικαιολόγητη απουσία τους από τον οργανισμό σε πολλές περιπτώσεις καρκίνων.

Το πείραμα 3 πραγματοποιήθηκε σε τρία ξεχωριστά υπό-πειράματα. Σε κάθε πείραμα μελετήθηκε το πώς οι μεταλλαγμένες μορφές των πρωτεϊνών επηρεάζουν την συγκέντρωση άλλων σημαντικών πρωτεϊνών με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση στην κανονική συμπεριφορά του κυττάρου.

Οι μεταλλάξεις στις πρωτεΐνες μοντελοποιήθηκαν με μεταβολή σε κάποιες πιθανοτικές τιμές που αφορούσαν την κάθε μια. Έτσι, μια πρωτεΐνη με αυξημένη πιθανοτική τιμή για κάποια αντίδραση, θα εμπλέκεται σε περισσότερες αντιδράσεις και θα επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την πορεία του συστήματος κατά την προσομοίωση.

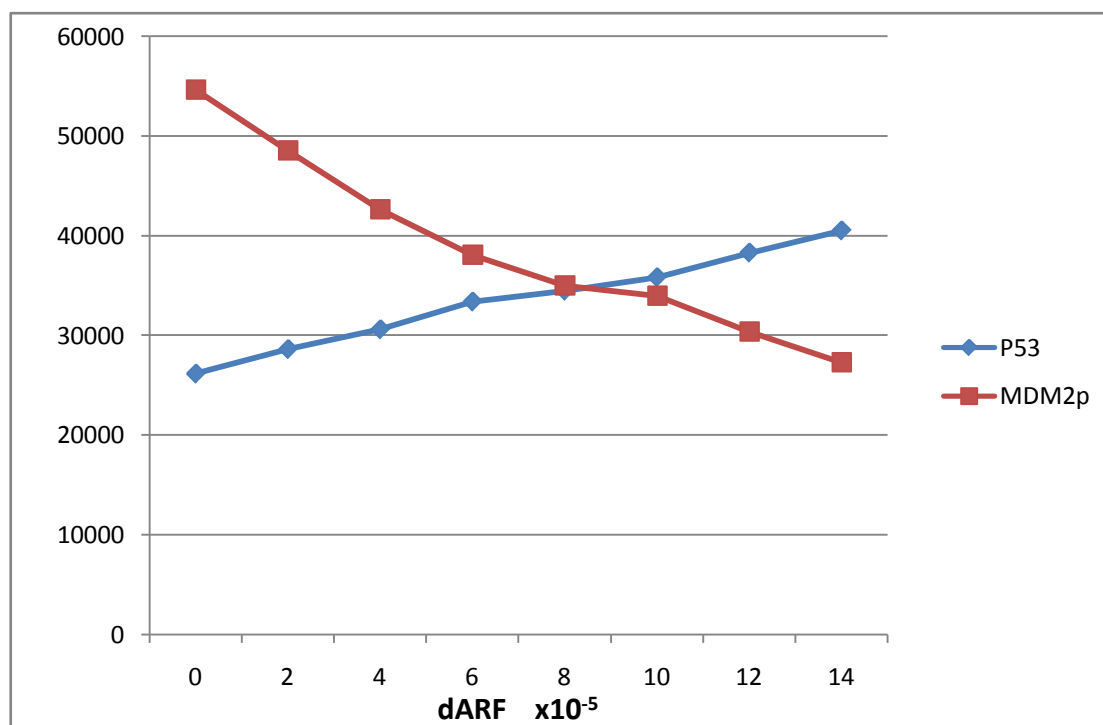
Το κάθε ένα από τα πειράματα αφορούσε μια από τις προαναφερθείσες πρωτεΐνες και προσομοίωνε 10 ώρες πραγματικού χρόνου στο εργαστήριο (διάρκεια φάσης G1).

Έχει παρατηρηθεί μέσα από έρευνες ότι η πρωτεΐνη ARF απουσιάζει από οργανισμούς που πάσχουν από καρκίνο στο πάγκρεας. Η ARF παίζει ουσιαστικό ρόλο στα κύτταρα με καταστραμμένο το γενετικό υλικό, αφού έχει την ιδιότητα να δεσμεύει και συνεπώς να καταστέλλει την ογκοπρωτεΐνη MDM2 η οποία προκαλεί την καταστολή της διορθωτικής πρωτεΐνης P53 της οποίας η δράση είναι αναγκαία σε τέτοιες περιπτώσεις. Για την μοντελοποίηση των μεταλλάξεων της ARF χρησιμοποιήθηκε η πιθανοτική τιμή που επηρεάζει την αντίδραση μεταξύ της ARF και της MDM2, αντίδραση η οποία προκαλεί την καταστολή της MDM2. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 6.3.1.

Όταν η πιθανοτική τιμή dARF έχει μεγάλη τιμή τότε στο μοντέλο σημαίνει ότι η ARF είναι ελαφρώς μεταλλαγμένη, ενώ μικρές τιμές για την dARF αντιστοιχούν σε μεγάλες μεταλλάξεις της ARF.

Στην γραφική παράσταση της εικόνας 6.3.1 παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών P53 και MDM2 σε 10 ώρες προσομοίωσης σε σχέση με τις μεταβολές στην πιθανοτική τιμή dARF. Για μεγάλες τιμές της dARF παρατηρείται μείωση στη

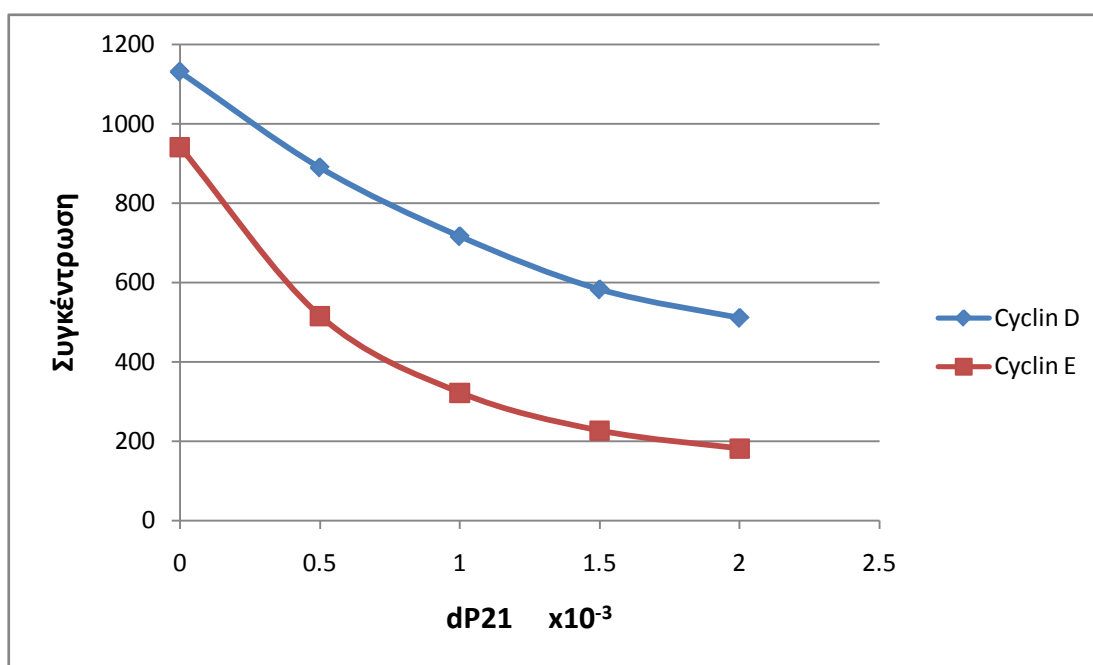
συγκέντρωση της πρωτεΐνης MDM2p, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση της P53. Αυτό συμβαίνει επειδή όσο μεγαλύτερη είναι η πιθανοτική τιμή dARF τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα να επιλεγεί προς εκτέλεση κατά την προσομοίωση η αντίδραση καταστολής των μορίων της MDM2 από τα αντίστοιχα της ARF. Ως εκ τούτου κατά την προσομοίωση του μοντέλου συμβαίνουν περισσότερες τέτοιες αντιδράσεις προκαλώντας μείωση στο πλήθος της πρωτεΐνης MDM2. Το γεγονός αυτό έχει σαν επακόλουθο αποτέλεσμα να συμβαίνουν λιγότερες αντιδράσεις καταστολής της P53 από την MDM2. Στις περιπτώσεις όμως που το dARF έχει μικρή τιμή στο μοντέλο (άρα η ARF είναι μεταλλαγμένη σε μεγάλο βαθμό) συμβαίνει ακριβώς το αντίθετο.



Εικόνα 6.3.1 : Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών P53 και MDM2 ως προς τη μεταβολή της πιθανοτικής τιμής dARF. Όσο αυξάνεται η πιθανοτική τιμή dARF, η συγκέντρωση της MDM2p μειώνεται επιτρέποντας την επιβίωση της P53.

Η αντίδραση καταστολής της MDM2 από την ARF έχει μικρότερη πιθανότητα να συμβεί κατά την προσομοίωση με αποτέλεσμα την διατήρηση της συγκέντρωσης της MDM2 σε υψηλά επίπεδα. Συνεπώς, οι αντιδράσεις καταστολής της P53 από την MDM2 έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να συμβούν, μειώνοντας την συγκέντρωση της P53. Έτσι, τυχόν φθορές στο γενετικό υλικό δεν μπορούν να διορθωθούν από την P53, επιτρέποντας στο κύτταρο να πολλαπλασιαστεί αλλοιωμένο με ό,τι και αν αυτό συνεπάγεται για τον οργανισμό!

Οιογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες p21 και FBXW7 (από εδώ και πέρα συμβολίζονται και αναφέρονται με p21) είναι συχνά μεταλλαγμένες σε πολλά είδη καρκίνων. Είναι εξαρτώμενες από την πρωτεΐνη p53 και συμπληρώνουν την δράση της ως προς την αποφυγή δημιουργίας όγκων. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη τους καταστέλλει την δραστηριότητα των κυκλινών D και E εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.

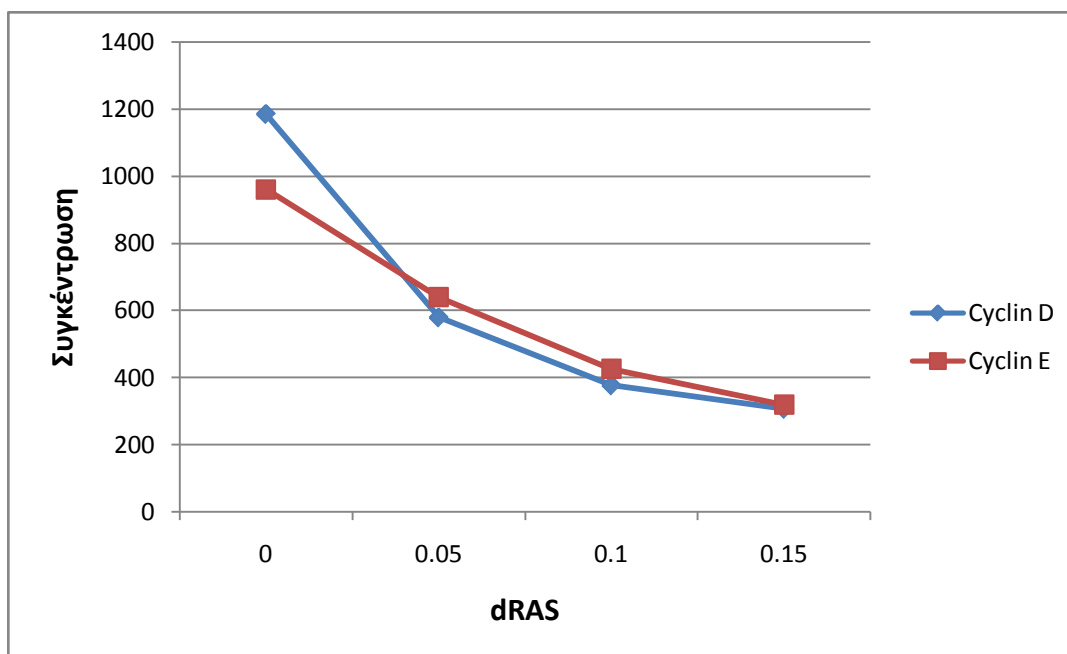


Εικόνα 6.3.2: Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης των Cyclin E και D ως προς τη μεταβολή της πιθανοτικής τιμής dP21. Όσο αυξάνεται η dP21 προκαλείται μείωση στη συγκέντρωση των κυκλινών.

Για την μοντελοποίηση των μεταλλαγμένων μορφών της p21 χρησιμοποιείται η πιθανοτική τιμή dP21 η οποία καθορίζει την πιθανότητα με την οποία η p21 αντιδρά με τις κυκλίνες D και E καταστέλλοντας τις. Τα αποτελέσματα από το πείραμα παρουσιάζονται στην εικόνα 6.3.2.

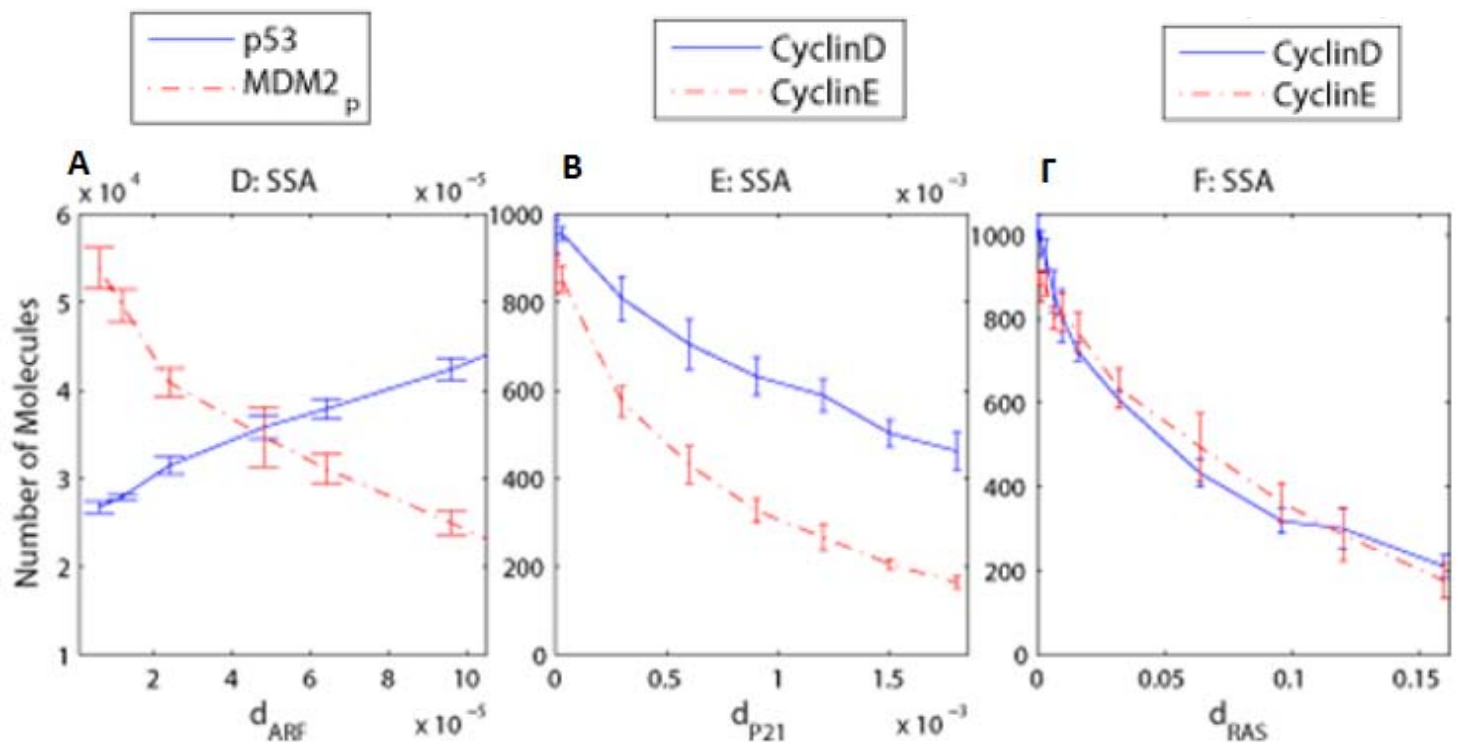
Όπως και με την ARF, έτσι και με την p21 οι μεγάλες μεταλλάξεις υποδεικνύονται με μικρή τιμή στο dP21 ενώ όσο το dP21 αυξάνεται η πρωτεΐνη p21 είναι πιο φυσιολογική. Στην εικόνα 6.3.2 φαίνεται ότι για μεγάλες τιμές στο dP21 υπάρχει μειωμένη συγκέντρωση των κυκλινών ενώ για μικρές τιμές παρατηρείται αυξημένη συγκέντρωση των κυκλινών, γεγονός το οποίο επιταχύνει την εξέλιξη του κύκλου ζωής του κυττάρου. Το πείραμα αυτό επιβεβαιώνει την αναμενόμενη συμπεριφορά.

Οι πρωτεΐνες K-RAS ανήκουν στην οικογένεια των RAS και βρίσκονται μεταλλαγμένες στα περισσότερα είδη καρκίνων και ιδιαίτερα σε περιπτώσεις καρκίνου στο πάγκρεας. Η ενεργοποίηση των RAS σηματοδοτείται από την HMGB1 και τους υποδοχείς της και από έρευνες είναι γνωστό ότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες K-RAS δεν μπορούν να απενεργοποιηθούν ακόμα και αν μειωθεί η συγκέντρωση της πρωτεΐνης HMGB1. Αποτέλεσμα αυτού είναι η συνεχόμενη ενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών που προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.



Εικόνα 6.3.3: Γραφική παράσταση της συγκέντρωσης των κυκλινών D και E ως προς τη μεταβολή της dRAS. Καθώς η πιθανοτική τιμή απενεργοποίησης των πρωτεϊνών RAS αυξάνεται, οι συγκεντρώσεις των κυκλινών μειώνονται, εμποδίζοντας τον πολλαπλασιασμό του κυττάρου.

Στο τρίτο πείραμα αυτής της ενότητας μελετήθηκε το πώς οι μεταβολές στην πιθανοτική τιμή dRAS επηρεάζουν την μοίρα του κυττάρου. Η dRAS χαρακτηρίζει την πιθανότητα με την οποία οι πρωτεΐνες RAS απενεργοποιούνται. Η εικόνα 6.3.3 παρουσιάζει τα αποτελέσματα του πειράματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μεγάλες πιθανοτικές τιμές για την απενεργοποίηση των RAS συνεπάγονται την μείωση στην συγκέντρωση των κυκλινών D και E, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο την εξέλιξη του κύκλου ζωής των κυττάρων. Συνεπώς, η αξία των αποτελεσμάτων του πειράματος αυτού έγκυται στο ότι εισηγούνται κάποιους τρόπους αντιμετώπισης περιπτώσεων καρκίνου. Αυτοί οι τρόποι αφορούν την στόχευση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκουν τις πρωτεΐνες RAS, τις κυκλίνες και τις κυκλινοεξαρτώμενες κινάσες CDK και την καταστολή των μορίων αυτών. Μάλιστα, πρόσφατα έχουν κατασκευαστεί φάρμακα θεραπείας του καρκίνου που καταστέλλουν τα CDK και RAS επιτυγχάνοντας την παρεμπόδιση αύξησης των όγκων.



Εικόνα 6.3.4 [4]: Α: Η μεταβολή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών p53 και MDM2 ως προς τη μεταβολή της πιθανοτικής τιμής d_{ARF} (μεταλλάξεις της πρωτεΐνης ARF). Β: Η μεταβολή της συγκέντρωσης των Κυκλινών D και E ως προς τη μεταβολή της πιθανοτικής τιμής d_{p21} (μεταλλάξεις της πρωτεΐνης p21). Γ: Η μεταβολή της συγκέντρωσης των Κυκλινών D και E ως προς τη μεταβολή της πιθανοτικής τιμής d_{RAS} (μεταλλάξεις των πρωτεϊνών RAS).

Η εικόνα 6.3.4. παρουσιάζει τα αποτελέσματα του αντίστοιχου πειράματος από το άρθρο [4]. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων Β και Γ είναι παρόμοια με αυτά των εικόνων 6.3.2 και 6.3.3. Όσον αφορά τα την γραφική Α παρατηρούμε ότι υπάρχει μια εμφανής διαφορά. Συγκεκριμένα, το σημείο τομής των δυο συγκεντρώσεων βρίσκεται περίπου στην τιμή 5 για τον άξονα των x , ενώ στην εικόνα 6.3.1 το αντίστοιχο σημείο βρίσκεται περίπου στην τιμή 8 του άξονα των x . Η διαφορά αυτή όμως δεν επηρεάζει την ποιότητα των αποτελεσμάτων μας αφού πολύ πιθανόν να οφείλεται στους λόγους που ήδη αναφέρθηκαν. Επίσης, αυτό που μας ενδιαφέρει είναι η γενική τάση των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνών και αυτή ταυτίζεται τόσο σε αυτό το πείραμα όσο και σε όλα τα υπόλοιπα πειράματα που έγιναν.

Κεφάλαιο 7

Συμπεράσματα

7.1 Συμπεράσματα	72
7.1.1. Συμπεράσματα σε σχέση με τις άλγεβρες διεργασιών	72
7.1.2. Συμπεράσματα σε σχέση με τα εργαλεία	74
7.1.3. Συμπεράσματα σε σχέση με το βιολογικό σύστημα	74
7.2. Μελλοντικές επεκτάσεις	75

7.1 Συμπεράσματα

7.1.1. Συμπεράσματα σε σχέση με τις άλγεβρες διεργασιών

Οι άλγεβρες διεργασιών εντάσσονται κάτω από την ομπρέλα των *τυπικών μεθόδων* (formal methods) κουβαλώντας όλα τα πλεονεκτήματα που φέρει αυτή η μέθοδος ανάλυσης και επαλήθευσης συστημάτων. Οι ακριβείς και μαθηματικά αποδεδειγμένες μέθοδοι που προσφέρουν, δίνουν τη δυνατότητα της επαλήθευσης συστημάτων από τη φάση σχεδιασμού, αποδοτικές και αυστηρές μεθόδους ελέγχου συστημάτων με μεγαλύτερη κάλυψη και ψηλότερη εγγύηση ορθότητας και μειώνουν σημαντικά το κόστος και τον χρόνο που απαιτείται για επαλήθευση συστημάτων.

Οι άλγεβρες διεργασιών στο επιστημονικό πεδίο της Πληροφορικής είναι μια οικογένεια μαθηματικών φορμαλισμών που χρησιμεύουν στην μοντελοποίηση της συμπεριφοράς

παράλληλων συστημάτων. Ο φορμαλισμός κάθε άλγεβρας διεργασιών αποτελείται από τη σύνταξη και τη σημασιολογία, τα οποία μας επιτρέπουν να μοντελοποιήσουμε τις διεργασίες που απαρτίζουν κάποιο σύστημα, τους τρόπους επικοινωνίας μεταξύ των διεργασιών και τους κανόνες με τους οποίους μπορούν να μοντελοποιηθούν οι ενέργειες που εκτελούν οι διεργασίες. Η σύνθεση όλων αυτών θα οδηγήσει στην μοντελοποίηση του συστήματος.

Δεδομένου ότι τα βιολογικά συστήματα είναι κυρίως παράλληλα συστήματα στα οποία οι οντότητες επικοινωνούν μεταξύ τους ανταλλάζοντας μηνύματα, οι άλγεβρες διεργασιών αποτελούν ένα πολύ υποσχόμενο εργαλείο για την μοντελοποίηση τέτοιων συστημάτων, αφού είναι κτισμένες σε τέτοιες ιδέες και υλοποιούν τέτοιους μηχανισμούς. Επιπλέον, η επινόηση των στοχαστικών αλγεβρών διεργασιών προσδίδουν ακόμα μεγαλύτερη ρεαλιστικότητα στα μοντέλα, εντάσσοντας την έννοια των πιθανοτήτων. Η ένταξη των πιθανοτικών συμπεριφορών στα μοντέλα επιτρέπουν την ποσοτικοποίηση των μορίων αλλά και την επίτευξη ρεαλιστικότερων προσομοιώσεων.

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε η άλγεβρα διεργασιών BetaBinders, η οποία κατασκευάστηκε εξ' αρχής για την μοντελοποίηση βιολογικών συστημάτων. Παρέχει τους μηχανισμούς για ακριβή μοντελοποίηση βιολογικών φαινομένων όπως είναι η απόκρυψη και η αποκάλυψη μερών στη δομή μιας πρωτεΐνης και η δυνατότητα επικοινωνίας και αλληλεπίδρασης με άλλες συγκεκριμένες οντότητες. Πρόκειται για μια άλγεβρα διεργασιών ισχυρά συνδεδεμένη και εμπνευσμένη από την π -calculus, γι' αυτό και χρησιμοποιεί την επικοινωνία ως το κυρίαρχο στοιχείο αλληλεπίδρασης μεταξύ συντρεχόντων (παράλληλων) διεργασιών.

Οι ανεπτυγμένες δυνατότητες που προσφέρει η BetaBinders οφείλονται σε μια εξειδικευμένη κλάση *συνδετών (binders)* οι οποίοι χρησιμοποιούνται για να εσωκλείσουν οποιαδήποτε διεργασία προέρχεται από την π -calculus μέσα στα λεγόμενα *κουτιά (boxes)*, τα οποία μάλιστα έχουν δυνατότητες.

Καταληκτικά, μπορεί να ισχυριστεί κανείς ότι η BetaBinders είναι μια από τις ιδανικότερες άλγεβρες διεργασιών που υπάρχουν μέχρι στιγμής για μοντελοποίηση βιολογικών

συστημάτων αφού κατασκευάστηκε εξ αρχής για την μοντελοποίηση βιολογικών λεπτομερειών.

7.1.2. Συμπεράσματα σε σχέση με τα εργαλεία

Στα πλαίσια αυτής της διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκε το περιβάλλον BetaWorkBench που κατασκευάστηκε από την ομάδα COSBI του Πανεπιστημίου του Τρέντο στην Ιταλία.

Στο περιβάλλον *BetaWorkBench* υπάρχουν υλοποιημένα κάποια μοναδικά χαρακτηριστικά στοιχεία τα οποία προσδίδουν σε αυτό μεγαλύτερη αξία σε σύγκριση με άλλα αντίστοιχα εργαλεία που χρησιμοποιούνται για μοντελοποίηση με άλγεβρες διεργασιών. Ένα από αυτά καθόρισε και την επιλογή του συγκεκριμένου εργαλείου για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής. Η υποστήριξη συναρτησιακών πιθανοτικών τιμών ήταν αναγκαία για την μοντελοποίηση του βιολογικού συστήματος που επιλέχθηκε και κάτι τέτοιο υποστηριζόταν μόνο από το εν λόγω εργαλείο.

Το BetaWorkBench παρέχει μια ολοκληρωμένη γκάμα εργαλείων για μοντελοποίηση συστημάτων, προσομοίωση μοντέλων και ανάλυση αποτελεσμάτων μέσα από επιμέρους λογισμικά. Ωστόσο, σε θέματα ευχρηστίας το εργαλείο SPiM υπερτερεί, αφού συνδυάζει τα πιο πάνω σε μόνο ένα λογισμικό με γραφικό περιβάλλον. Επιπλέον, η λειτουργία του SPiM είναι πιο εύκολη στην μάθηση και πιο κατανοητή σε σχέση με το BetaWorkBench, το οποίο παρουσιάζει δυσκολία στην εξοικείωση με τον τρόπο μοντελοποίησης που υποστηρίζει.

7.1.3. Συμπεράσματα σε σχέση με το βιολογικό σύστημα

Τα *insilico* πειράματα που έγιναν και παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 6 ενοχοποιούν το δίκτυο σηματοδοτικών μονοπατιών της πρωτεΐνης HMGB1 στην ανάπτυξη καρκίνου στον οργανισμό.

Η υπερσυγκέντρωση της HMGB1 στο οργανισμό ενεργοποιεί μια σειρά από αλληλεπιδράσεις που οδηγούν στην μείωση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης P53 που είναι απαραίτητη μέσα από την δράση της στην καταστολή των καρκινικών κυττάρων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση της ογκοπρωτεΐνης E2F που οδηγεί

στον πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Επίσης, η υπερσυγκέντρωση της HMGB1 έχει ως αποτέλεσμα τα υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης των κυκλινών D και E οι οποίες προάγουν την κυτταρική διαίρεση.

Τέλος, η ύπαρξη μεταλλαγμένων πρωτεϊνών σε συνδυασμό με την υπερσυγκέντρωση της HMGB1 μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκινωμάτων στον οργανισμό. Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα του πειράματος 3 από το κεφάλαιο 6 η υπερσυγκέντρωση της HMGB1 προκαλεί αυξημένη συγκέντρωση της MDM2, η οποία χωρίς την ανασταλτική δράση της ARF μπορεί να οδηγήσει σε δυσάρεστες εξελίξεις. Συνεπώς, αν η ARF βρίσκεται μεταλλαγμένη στον οργανισμό και υπάρχει υπερσυγκέντρωση της MDM2, τότε πολλαπλασιάζονται οι πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου. Επιπλέον, μεταλλάξεις στην πρωτεΐνη p21, οδηγούν στην μη καταστολή των κυκλινών D και E οι οποίες προάγουν την κυτταρική διαίρεση ακόμα και όταν υπάρχουν αλλοιώσεις στο γενετικό υλικό του κυττάρου.

7.2. Μελλοντικές επεκτάσεις

Το μοντέλο που κατασκευάστηκε στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας αξίζει περαιτέρω πειραματικής διερεύνησης. Σε μεταγενέστερο στάδιο θα μπορούσαν να πραγματοποιηθούν *insilico* πειράματα που θα μελετούν εις βάθος και άλλες πρωτεΐνες για τις οποίες υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι εμπλέκονται σε καρκινογενέσεις. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι οι RB και E2F [15].

Επιπλέον, το μοντέλο θα μπορούσε να επεκταθεί συμπεριλαμβάνοντας τα μόρια FOXO1, Bim, Bcl-2 και Bax που εμπλέκονται στην απόπτωση των κυττάρων. Αυτά τα μόρια περιλαμβάνονται σε ένα σηματοδοτικό μονοπάτι που καταστέλλεται από την πρωτεΐνη AKT και η οποία υπάρχει ήδη στο μοντέλο. Έτσι, μεταλλάξεις και ανωμαλίες στην φυσιολογική λειτουργία των εν λόγω μορίων πιθανό να επηρεάζουν ή ακόμα αποτρέπουν το φυσιολογικό θάνατο των κυττάρων οδηγώντας σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό τους και συνεπώς στην δημιουργία όγκων.

Τέλος, το μοντέλο θα μπορούσε να επεκταθεί προσθέτοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι NFκB, το οποίο έχει βρεθεί να επηρεάζει τον κύκλο ζωής των κυττάρων [29].

Βιβλιογραφία

- [1] A. Regev and E. Shapiro, "Cell as computation", Nature, vol.419, p.343, September 2002, doi: 10.1038/419343a
- [2] J. Fisher and T. Henzinger, "Executable Cell Biology", Nature Biotechnology, vol.25, p.1239-1249, November 2007, doi:10.1038/nbt1356
- [3] Andrew Phillips and Luca Cardelli, "Efficient, correct simulation of biological processes in the stochastic pi-calculus". In *Computational Methods in Systems Biology*, volume 4695 of LNCS, pages 184-199. Springer, September 2007
- [4] H. Gong, P. Zuliani, A. Komuravelli, J. R. Faeder, and E. M. Clarke. "Analysis and verification of the HMGB1 signaling pathway". In *BMC Bioinformatics, Tokyo, Japan, 2010*.
- [5] J. Parrow. "An Introduction to the π -Calculus", chapter 8, pages 479–543. Handbook of Process Algebra. Elsevier, 2001.
- [6] C. Priami. "Stochastic π -calculus". *The Computer Journal*, vol.38: p.578-589, 1995
- [7] C. Priami and P. Quaglia, "Beta-binders for biological interactions", Proceedings of CMSB, vol.3082, p.20-33, 2004
- [8] A. Phillips, L. Cardelli, M. Lakin, F. Polo, Microsoft Research, "Stochastic Pi Machine", <http://research.microsoft.com/spim>
- [9] Betawb, COSBI, The Microsoft Research - University of Trento Centre for Computational and Systems Biology, <http://www.cosbi.eu/index.php/research/prototypes/betawb>
- [10] Ι.Γ.Γεωργιάτσου, 2001. Εισαγωγή στη Βιοχημεία (Πέμπτη Έκδοση). Εκδόσεις Γιαχούδη, ISBN 960-7425-02-2

- [11] X. Χριστοδούλου, Μ. Χατζηστεφάνου, 2007. Βιολογία Γ' Ενιαίου Λυκείου. Υπηρεσία Ανάπτυξης Προγραμμάτων ISBN: 9963-0-4477-8
- [12] X. Μέγας, “Μηχανισμοί ενεργοποίησης του μεταγραφικού παραγοντα NF-κΒ από τους ρολούς της πρωτεΐνης TRAF6”, 2010
- [13] B.K. Ζουμπουρλής, Σ. Σολακίδη, “Ο Ρόλος της Ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 στον καρκίνο”, Ογκολογική Ενημέρωση 5:2, p.98-103, 2003
- [14] Γ. Ρήγας, Α. Αθανασίου, “Ο κυτταρικός κύκλος”, Κλινική Ογκολογία, Τόμος Α, Κεφάλαιο 9, σελ.127-138, Ιούλιος 2007
- [15] J.R. Nevins, “The Rb/E2F pathway and cancer”, Human Molecular Genetics, vol. 10, p. 699–703, 2001
- [16] A.L. Gartel, A.L. Tyner, “The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis”, Molecular Cancer Therapeutics, vol.1, p.639–649, June 2002
- [17] Α. Φιλίππου, Εισαγωγή: Σημειώσεις μαθήματος ΕΠΛ664 – Ανάλυση και Επαλήθευση Συστημάτων, 2012
- [18] J.C.M. Baeten, “A brief history of process algebra, ” *Theoretical Computer Science*, vol. 335, p. 131-146, 2005.
- [19] R. Milner, Communication and Concurrency, Prentice Hall, 1995.
- [20] F. Ciocchetta, C. Priami, P. Quaglia, “Modeling Kohn Interaction Maps with Beta-Binders: An example”, Transactions on Computational Systems Biology III, Springer, LNBI.3737, p. 33–48, 2005
- [21] Lorenzo Dematté, Roberto Larcher, Alida Palmisano, Corrado Priami, Alessandro Romanel, “*Programming Biology in BlenX*”. In **Systems Biology for Signaling Networks** 1:777-820, Ed. Sangdun Choi, © Springer, 2010.
- [22] L. Dematté, C. Priami, A. Romanel, “The BlenX language: A tutorial”, LNCS, vol. 5015 Springer (2008), p. 313–365 (Chapter for the Tutorial of SFM-08:Bio)

- [23] L. Dematté, C. Priami, A. Romanel. *The Beta Workbench: a computational tool to study the dynamics of biological systems*. **Briefings in Bioinformatics**, 9(5): 437-449, 2008 # © Oxford Journals, 2008.
- [24] D.T. Gillespie. "A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions". *J. Phys. Chem.*, 22:403-434, 1976.
- [25] D.T. Gillespie. "Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions". *J. Phys. Chem.*, 81(25):2340-2361, 1977.
- [26] A. Phillips, "A Visual Process Calculus for Biology", in *Symbolic Systems Biology: Theory and Methods*, Jones and Bartlett Publishers, In Press, 2009
- [27] Andrew Phillips, Luca Cardelli, Giuseppe Castagna, A graphical representation for biological processes in the stochastic pi-calculus. *Transactions in Computational Systems Biology*, 4230:123-152, November 2006
- [28] Geva-Zatorsky N, Rosenfeld N, Itzkovitz S, Milo R, Sigal A, Dekel E, Yarnitzky T, Liron Y, Polak P, Lahav G, Alon U: Oscillations and variability in the p53 system. *Molecular Systems Biology*, 2:2006.0033, 2006
- [29] Gong, H. and Zuliani, P. and Komuravelli, A. and Faeder, J. and Clarke, E., Computational modeling and verification of signaling pathways in cancer. *Algebraic and Numeric Biology*. p. 117-135, Springer, 2012

Παράρτημα Α

Σε αυτό το παράρτημα υπάρχει το μοντέλο που κατασκευάστηκε για το βιολογικό σύστημα του σηματοδοτικού δικτύου μονοπατιών της πρωτεΐνης HMGB1. Το μοντέλο είναι γραμμένο στην γλώσσα BlenX και χωρίζεται σε τρία αρχεία όπως αυτό απαιτείται από το εργαλείο BetaWorkBench που το προσομοιώνει.

Οι αρχικές συγκεντρώσεις των μορίων που φαίνονται στο αρχείο “model.prog” αφορούν τις συγκεντρώσεις του πειράματος 1 από το Κεφάλαιο 6. Με πράσινο χρώμα φαίνονται κάποια από τα σχόλια στο κώδικα και με μπλε χρώμα κάποιες λέξεις κλειδιά της γλώσσας BlenX.

A.1. Αρχείο “model.prog”

```

/*****TEMPLATES*****/
template spont_degradation: pproc<<rate kin_rate>>= die(rate(kin_rate));
template guard_spont_degradation: pproc<<name N1,binder state,rate kin_rate>>= (if (N1,state) then die(rate(kin_rate))endif);
template receive_degradation_signal: pproc<<name N1,binder state, name chan>>= (if (N1,state) then chan?().die endif);

/*****MAIN MODEL *****/
/*HMGB1 protein*/
let HMGB1: bproc = #(x,HMGB1_out)[rep x!().nil]; //1

/*RAGE protein*/
let phosphorylation_dephosphorylation_RAGE: pproc=
if (x,RAGEu_type) then x?().ch(x,RAGEp_type).unhide(y).unhide(z).rec1!().nil endif //1
  +if (x,RAGEp_type) then ch(rate(d1),x,RAGEu_type).hide(y).hide(z).rec1!().nil endif //2
;
let send_phosphorylation_signal_to_Pi3Ku: pproc = if (x,RAGEp_type) then y!().rec2!().nil endif;
let send_phosphorylation_signal_to_RASu: pproc = if (x,RAGEp_type) then z!().rec3!().nil endif;
let RAGE_process: pproc =
  phosphorylation_dephosphorylation_RAGE | rep rec1?().phosphorylation_dephosphorylation_RAGE | //1,2
  send_phosphorylation_signal_to_Pi3Ku | rep rec2?().send_phosphorylation_signal_to_Pi3Ku | //3
  send_phosphorylation_signal_to_RASu | rep rec3?().send_phosphorylation_signal_to_RASu; //25
let RAGEu: bproc = #(x,RAGEu_type),#h(y,RAGEp_out_Pi3Ku),#h(z,RAGEp_out_RASu)[RAGE_process];
let RAGEp: bproc = #(x,RAGEp_type),#(y,RAGEp_out_Pi3Ku),#(z,RAGEp_out_RASu)[RAGE_process];

/*PI3K protein*/
let phosphorylation_dephosphorylation_PI3K: pproc=
if (x,PI3Ku_type) then x?().ch(x,PI3Kp_type).unhide(y).rec1!().nil endif //3,26
  +if (x,PI3Kp_type) then ch(rate(d2),x,PI3Ku_type).hide(y).rec1!().nil endif ; //4
let send_phosphorylation_signal_to_PIPu: pproc= if (x,PI3Kp_type) then y!().rec2!().nil endif; //5
let PI3K_process: pproc =
phosphorylation_dephosphorylation_PI3K | rep rec1?().phosphorylation_dephosphorylation_PI3K |
  send_phosphorylation_signal_to_PIPu | rep rec2?().send_phosphorylation_signal_to_PIPu ;
let PI3Ku: bproc = #(x,PI3Ku_type),#h(y,PI3Kp_out_PIPu)[PI3K_process];
let PI3Kp: bproc = #(x,PI3Kp_type),#(y,PI3Kp_out_PIPu)[PI3K_process];
```

```

/*PIP protein*/
let phosphorylation_dephosphorylation_PIP: pproc=
x?().(    if (x,PIPu_type) then ch(x,PIPp_type).unhide(y).rec1!().nil endif    //5: PI3Kp phosphorylates PIPu
        +if (x,PIPp_type) then ch(x,PIPu_type).hide(y).rec1!().nil endif    //6: PTEN dephosphorylates PIPp
);
let send_phosphorylation_signal_to_AKTu: pproc= if (x,PIPp_type) then y!().rec2!().nil endif;    //7: PIPp phosphorylates AKTu
let PIP_process: pproc =
    phosphorylation_dephosphorylation_PIP | rep rec1?().phosphorylation_dephosphorylation_PIP |
    send_phosphorylation_signal_to_AKTu | rep rec2?().send_phosphorylation_signal_to_AKTu;
let PIPu: bproc=#(x,PIPu_type),#h(y,PIPp_out_AKTu)[PIP_process];
let PIPp: bproc=#(x,PIPp_type),#(y,PIPp_out_AKTu)[PIP_process];

/*PTEN protein*/
let send_dephosphorylation_signal_to_PIPp: pproc = y!().rec1!().nil;
let PTEN_process: pproc =
    send_dephosphorylation_signal_to_PIPp | rep rec1?().send_dephosphorylation_signal_to_PIPp | //6
    spont_degradation<<d5>>;    //21
let PTEN: bproc=#(x,PTEN_type),#(y,PTEN_out_PIPp)[PTEN_process];

/*AKT protein*/
let phosphorylation_dephosphorylation_AKT: pproc=
if (x,AKTu_type) then x?().ch(x,AKTp_type).unhide(y).rec1!().nil endif    //7
    +if (x,AKTp_type) then ch(rate(d4),x,AKTu_type).hide(y).rec1!().nil endif ;    //8
let send_phosphorylation_signal_to_MDM2u: pproc= if (x,AKTp_type) then y!().rec2!().nil endif;    //9
let AKT_process: pproc=
    phosphorylation_dephosphorylation_AKT | rep rec1?().phosphorylation_dephosphorylation_AKT |
    send_phosphorylation_signal_to_MDM2u | rep rec2?().send_phosphorylation_signal_to_MDM2u ;
let AKTu: bproc=#(x,AKTu_type),#h(y,AKTp_out_MDM2u)[AKT_process];
let AKTp: bproc=#(x,AKTp_type),#(y,AKTp_out_MDM2u)[AKT_process];

/*MDM2 protein*/
let phosphorylation_dephosphorylation_MDM2: pproc=
if (x,MDM2u_type) then x?().ch(x,MDM2p_type).unhide(y).unhide(w).rec1!().nil endif    //9
    +if (x,MDM2p_type) then ch(rate(d8),x,MDM2u_type).hide(y).hide(w).rec1!().nil endif ;    //10
let send_degradation_signal_to_P53: pproc = if (x,MDM2p_type) then y!().rec2!().nil endif;    //19

```

```

let MDM2_process: pproc=
  phosphorylation_dephosphorylation_MDM2 | rep rec1?().phosphorylation_dephosphorylation_MDM2| //9,10
  guard_spont_degradation<<x,MDM2u_type,d7>> | //11
  guard_spont_degradation<<x,MDM2p_type,d8p>> | //12
  receive_degradation_signal<<x,MDM2p_type,w>>| //15
  receive_degradation_signal<<x,MDM2p_type,z>>| //53
  receive_degradation_signal<<x,MDM2u_type,z>>| //54
  send_degradation_signal_to_P53 | rep rec2?().send_degradation_signal_to_P53 //19
;
let MDM2u:bproc=#(x,MDM2u_type),#h(y,MDM2p_out_P53),#(z,MDM2_in_ARF),#h(w,MDM2p_in_DNAD)[MDM2_process];
let MDM2p:bproc=#(x,MDM2p_type),#(y,MDM2p_out_P53), #(z,MDM2_in_ARF),#(w,MDM2p_in_DNAD)[MDM2_process];

/*mdm2t transcription factor*/
let mdm2t: bproc =#(x,mdm2t_type) [ spont_degradation<<d7>> //14 ];

/*DNA-DNAD*/
let send_degradation_signal_to_MDM2p:pproc = if (x,DNAD_type) then x!().rec1!().nil endif; //15
let receive_fixing_signal_from_P53: pproc = if(x,DNAD_type) then y?().ch(x,DNA_type).hide(y).rec2!().nil endif; //24
let DNA_process:pproc=
send_degradation_signal_to_MDM2p| rep rec1?().send_degradation_signal_to_MDM2p|
  receive_fixing_signal_from_P53 | rep rec2?().receive_fixing_signal_from_P53;
let DNAD: bproc=#(x,DNAD_type), #(y,DNAD_in_P53) [DNA_process];
let DNA: bproc=#(x,DNA_type),#h(y,DNAD_in_P53) [DNA_process];

/*P53 protein*/
let receive_degradation_signal_from_MDM2p: pproc = x?().die.nil; //19
let send_fixing_signal_to_DNAD:pproc =y!().rec1!().nil; //24
let P53: bproc =#(x,P53_type),#(y,P53_out_DNAD)
[
  spont_degradation<<d9>>| //18
  receive_degradation_signal_from_MDM2p| //19
send_fixing_signal_to_DNAD| rep rec1?().send_fixing_signal_to_DNAD //24
];

```

```

/*RAS protein*/
let phosphorylation_dephosphorylation_RAS: pproc=
if (x,RASu_type) then x?().ch(x,RASp_type).unhide(y).unhide(w).rec1!().nil endif          //25
    +if (x,RASp_type) then ch(rate(b1),x,RASu_type).hide(y).hide(w).rec1!().nil endif;          //27
let send_phosphorylation_signal_to_PI3Ku_RASp: pproc= if (x,RASp_type) then w!().rec2!().nil endif;          //26
let send_phosphorylation_signal_to_RAFu: pproc= if (x,RASp_type) then y!().rec3!().nil endif;          //28
let RAS_process: pproc=
    phosphorylation_dephosphorylation_RAS |rep rec1?().phosphorylation_dephosphorylation_RAS| //25,27
    send_phosphorylation_signal_to_PI3Ku_RASp |rep rec2?().send_phosphorylation_signal_to_PI3Ku_RASp | //26
    send_phosphorylation_signal_to_RAFu |rep rec3?().send_phosphorylation_signal_to_RAFu ; //28
let RASu: bproc= #(x,RASu_type),#h(y,RASp_out_RAFu),#h(w,RASp_out_PI3Ku)[RAS_process];
let RASp: bproc= #(x,RASp_type),#(y,RASp_out_RAFu),#(w,RASp_out_PI3Ku)[RAS_process];

/*RAF protein*/
let phosphorylation_dephosphorylation_RAF: pproc=
if (x,RAFu_type) then x?().ch(x,RAFp_type).unhide(y).rec1!().nil endif          //28
    +if (x,RAFp_type) then ch(rate(b2),x,RAFu_type).hide(y).rec1!().nil endif ;          //29
let send_phosphorylation_signal_to_MEKu: pproc= if(x,RAFp_type) then y!().rec2!().nil endif;
let RAF_process: pproc =
    phosphorylation_dephosphorylation_RAF |rep rec1?().phosphorylation_dephosphorylation_RAF| //28,29
    send_phosphorylation_signal_to_MEKu |rep rec2?().send_phosphorylation_signal_to_MEKu ;
let RAFu: bproc= #(x,RAFu_type),#h(y,RAFp_out_MEKu)[RAF_process];
let RAFp: bproc= #(x,RAFp_type),#(y,RAFp_out_MEKu) [RAF_process];

/*MEK protein*/
let phosphorylation_dephosphorylation_MEK: pproc=
if (x,MEKu_type) then x?().ch(x,MEKp_type).unhide(y).rec1!().nil endif          //30
    + if (x,MEKp_type) then ch(rate(b3),x,MEKu_type).hide(y).rec1!().nil endif          //31
;
let send_phosphorylation_signal_to_ERK: pproc= if(x,MEKp_type) then y!().rec2!().nil endif;
let MEK_process: pproc =
    phosphorylation_dephosphorylation_MEK |rep rec1?().phosphorylation_dephosphorylation_MEK| //30,31
    send_phosphorylation_signal_to_ERK |rep rec2?().send_phosphorylation_signal_to_ERK //32
;
let MEKu: bproc= #(x,MEKu_type),#h(y,MEKp_out_ERKu)[MEK_process];
let MEKp: bproc= #(x,MEKp_type),#(y,MEKp_out_ERKu) [MEK_process];

```

```

/*ERK protein*/
let phosphorilation_dephosphorilation_ERK: pproc=
if (x,ERKu_type) then x?().ch(x,ERKp_type).rec1!().nil endif          //30
    + if (x,ERKp_type) then ch(rate(b4),x,ERKu_type).rec1!().nil endif ;          //31
let ERK_process: pproc= phosphorilation_dephosphorilation_ERK| rep rec1?().phosphorilation_dephosphorilation_ERK; //32,33
let ERKu: bproc=#(x,ERKu_type)[ERK_process];
let ERKp: bproc=#(x,ERKp_type)[ERK_process];

/*Myc protein*/
let Myc: bproc=#(x,Myc_type) [ spont_degradation<<b5>>          //35      ];

/*Cyclin D protein*/
let send_decomplex_signal_to_RE: pproc= y!().rec1!().nil;
let send_phosphorilation_signal_to_RB: pproc= z!().rec2!().nil;
let CD: bproc=#(x,CD_type),#(y,CD_out_RE),#(z,CD_out_RB),#(w,CD_in_P21),#(m,CD_in_INK4A)
    [ spont_degradation<<b6>>          |
      send_decomplex_signal_to_RE      | rep rec1?().send_decomplex_signal_to_RE|          //40
      send_phosphorilation_signal_to_RB | rep rec2?().send_phosphorilation_signal_to_RB|      //44
      receive_degradation_signal<<x,CD_type,w>>|          //55
      receive_degradation_signal<<x,CD_type,m>>    ];          //58

/*Cyclin E protein*/
let send_decomplex_signal_to_RE_CE: pproc= z!().rec1!().nil;
let CE: bproc=#(x,CE_type),#(y,CE_in_P21),#(z,CE_out_RE)
    [
      spont_degradation<<b12>>          |          //50
      receive_degradation_signal<<x,CE_type,y>>|          //56
send_decomplex_signal_to_RE_CE| rep rec1?().send_decomplex_signal_to_RE_CE          //60
    ];

/*INK4A protein*/
let send_degradation_signal_to_CD: pproc= y!().rec1!().nil;          //58
let INK4A: bproc= #(x,INK4A_type),#(y,INK4A_out_CD)
    [ send_degradation_signal_to_CD| rep rec1?().send_degradation_signal_to_CD| //58
      spont_degradation<<b13>>          ];

```

```

/*E2F protein*/
let E2F:bproc= #(x,E2F_type) [ spont_degradation<<b10>>           //41 ];

/*RB protein*/
let phosphorilation_dephosphorilation_RB: pproc =
if (x,RBu_type) then x?().ch(x,RBp_type).rec1!().nil endif //44
+ if (x,RBp_type) then ch(rate(b8),x,RBu_type).rec1!().nil endif; //46
let RB_process: pproc =
phosphorilation_dephosphorilation_RB| rep rec1?().phosphorilation_dephosphorilation_RB| //44,46
guard_spont_degradation<<x,RBu_type,b9>>| //45
guard_spont_degradation<<x,RBp_type,b8p>> //47
;
let RBu: bproc= #(x,RBu_type)[RB_process];
let RBp: bproc= #(x,RBp_type)[RB_process];

/*RE complex: E2F + RBu*/
let receive_decomplex_signal_from_CD: pproc =
if (x,RE_type) then y?().ch(x,RE_decomplex_type).hide(y).hide(z).rec1!().nil endif;
let receive_decomplex_signal_from_CE: pproc =
if (x,RE_type) then z?().ch(x,RE_decomplex_type).hide(y).hide(z).rec2!().nil endif;
let RE_process: pproc=
spont_degradation<<b7>> | //48
receive_decomplex_signal_from_CD| rep rec1?().receive_decomplex_signal_from_CD| //40
receive_decomplex_signal_from_CE| rep rec2?().receive_decomplex_signal_from_CE //60
;
let RE: bproc= #(x,RE_type),#(y,RE_in_CD),#(z,RE_in_CE) [RE_process];
let RE_decomplex: bproc= #(x,RE_decomplex_type),#h(y,RE_in_CD),#h(z,RE_in_CE) [RE_process];

/*ARF protein*/
let send_degradation_signal_to_MDM2: pproc = y!().rec1!().nil;
let ARF: bproc = #(x,ARF_type),#(y,ARF_out_MDM2)
[ spont_degradation<<b11>> | //52
send_degradation_signal_to_MDM2| rep rec1?().send_degradation_signal_to_MDM2 //53,54
];

```

```

/*P21 protein*/
let send_degradation_signal_to_CD: pproc = y!().rec1!().nil;
let send_degradation_signal_to_CE: pproc = z!().rec2!().nil;
let P21: bproc=#(x,P21_type),#(y,P21_out_CD),#(z,P21_out_CE)
    [ spont_degradation<<d10>> |                                     //23
      send_degradation_signal_to_CD | rep rec1?().send_degradation_signal_to_CD | //55
      send_degradation_signal_to_CE | rep rec2?().send_degradation_signal_to_CE //56
    ];

/*I generator*/
let I:bproc=#(x,I_type)[nil];

/*****EVENTS*****/
when(mdm2t::rate(k7)) split(mdm2t,MDM2u);           //13
when(P53::fhill1) split(P53,mdm2t);                 //16
when(P53::fhill2) split(P53,PTEN);                  //20
when(P53::fhill3) split(P53,P21);                   //22
when(ERKp::fhill4) split(ERKp,Myc);                 //34
when(ERKp::fhill5) split(ERKp,CD);                  //36
when(Myc::fhill6) split(Myc,CD);                    //37
when(Myc::fhill7) split (Myc,E2F);                 //39
when(E2F,RBu::rate(a7)) join(RE);                   //42
when(E2F::fhill8) split(E2F,CE);                   //49
when(E2F::fhill9) split(E2F,ARF);                   //51
when(RE_decomplex::inf) split(E2F,RBp);             //40,60
when(I::rate(k9)) split(I,P53);                     //17
when(I::rate(a9)) split(I,RBu);                     //43
when(I::rate(a13)) split(I,INK4A);                  //57

/*Initial Concentrations*/
run 1000 HMGB1 || 1000 RAGEu || 100000 PI3Ku || 100000 PIPu || 100000 AKTu || 10000 MDM2u || 20000 MDM2p || 20000 P53 ||
10000 RASu || 10000 RAFu || 10000 MEKu || 10000 ERKu || 100000 RE || 1 I

```

A.2. Αρχείο “model.func”

```
/******CONSTANT VALUES *****/
let k1: const= 2e-5;    let k2: const= 5.4e-5;    let k2p: const= 3e-7;    let k3: const= 3e-6;    let k4: const= 1.2e-7;    let k5: const= 28;
let k6: const= 32;      let k7: const= 30;      let k8: const= 4e-7;    let k9: const= 1200;    let k10: const= 8;      let Ka: const= 8e4;
let Kb: const= 8e4;     let Kc: const= 8e4;     let Kd: const= 4e3;     let Ke: const= 1e3;     let Kf: const= 1e3;     let Kg: const= 1e3;
let Ki: const= 3e5;     let Kh: const= 3e5;     let d1: const= 2e-2;    let d2: const= 5e-3;    let d3: const= 3.5e-5;  let d4: const= 1.2e-2;
let d5: const= 6e-3;    let d7: const= 1.4e-2;  let d7p: const= 6.5e-6; let d8: const= 3e-2;    let d8p: const= 1.3e-2; let d9: const= 1.2e-2;
let d9p: const= 6e-7;   let d10: const=1.8e-2;  let a1: const =2e-5;    let a2: const =1e-7;    let a3: const =4e-7;    let a4: const =8e-7;
let a5: const =90;      let a6: const =50;      let a6p: const=90;      let a7: const =1e-6;    let a8: const =1e-5;    let a9: const =40;
let a10: const=60;      let a11:const =10;      let a12: const =170;    let a13: const=40;      let b1: const =1.6e-3;   let b2: const =9e-3;
let b3:const =1.8e-3;    let b4: const =2e-3;    let b5: const =1.2e-2;  let b6:const=3.5e-2;    let b6p: const=3e-7;    let b6pp: const = 3e-6;
let b7: const =5e-4;    let b7p: const= 6e-6;   let b8: const =6e-6;    let b8p: const =4e-4;   let b9: const =5e-4;    let b10:const=4e-4;
let b11: const =5e-3;   let b12: const =3.5e-2; let b12p: const =3e-7;  let b13: const =3e-3;   let n1: const =1.0;     let n2: const = 2.0;
let n3: const=3.0;      let dm1: const = 9e-3;  let h0: const = 27.0;   let g0: const = 2e-2;   let v0: const = 1e5;

/******FUNCTIONS *****/
//16: fhill1=Hill(k6,Kb,n3)
let fhill1: function =(k6*pow(|P53|,n3))/(pow(Kb,n3)+pow(|P53|,n3)) ;
//20: fhill2=Hill(k5,Ka,n3)
let fhill2: function =(k5*pow(|P53|,n3))/(pow(Ka,n3)+pow(|P53|,n3)) ;
//22: fhill3=Hill(k10,Kc,n2)
let fhill3: function =(k10*pow(|P53|,n2))/(pow(Kc,n2)+pow(|P53|,n2));
//24: fhill10=Hill(g0,v0,n2)
let fhill10: function =(g0*pow(|P53|,n2))/(pow(v0,n2)+pow(|P53|,n2))*|DNAD|;
//34: fhill4=Hill(a5,Kd,n1)
let fhill4: function =(a5*pow(|ERKp|,n1))/(pow(Kd,n1)+pow(|ERKp|,n1));
//36: fhill5=Hill(a6,Ke,n1)
let fhill5: function =(a6*pow(|ERKp|,n1))/(pow(Ke,n1)+pow(|ERKp|,n1));
//37: fhill6=Hill(a6p,Kf,n1)
let fhill6: function =(a6p*pow(|Myc|,n1))/(pow(Kf,n1)+pow(|Myc|,n1));
//39: fhill7=Hill(a10,Kg,n1)
let fhill7: function =(a10*pow(|Myc|,n1))/(pow(Kg,n1)+pow(|Myc|,n1));
//49: fhill8=Hill(a12,Ki,n1)
let fhill8: function =(a12*pow(|E2F|,n1))/(pow(Ki,n1)+pow(|E2F|,n1));
//51: fhill9=Hill(a11,Kh,n1)
let fhill9: function =(a11*pow(|E2F|,n1))/(pow(Kh,n1)+pow(|E2F|,n1));
```

A.3. Αρχείο “model.types”

```
{
    HMGB1_out, RAGEu_type, RAGEp_type, RAGEp_out_PI3Ku, RAGEp_out_RASu, PI3Ku_type, PI3Kp_type, PI3Kp_out_PIPu, PIPu_type,
    PIPp_type, RASu_type, RASp_type, RASp_out_PI3Ku, PIPp_out_AKTu, PTEN_type, PTEN_out_PIPp, AKTu_type, AKTp_type,
    AKTp_out_MDM2u, MDM2u_type, MDM2p_type, MDM2p_out_P53, MDM2_in_ARF, MDM2p_in_DNAD, P53_type, ARF_type,
    DNAD_type, mdm2t_type, DNAD_in_P53, DNA_type, P53_out_DNAD, RASp_out_RAFu, RAFu_type, RAFp_type, RAFp_out_MEKu,
    MEKu_type, MEKp_type, MEKp_out_ERKu, ERKu_type, ERKp_type, Myc_type, CD_type, CD_out_RE, CD_out_RBu, CD_in_P21,
    CD_in_INK4A, RE_in_CD, RBu_type, P21_out_CD, INK4A_out_CD, CE_type, CE_in_P21, CE_out_RE, P21_out_CE, RE_in_CE,
    INK4A_type, E2F_type, RBp_type, RE_decomplex_type, RE_type, ARF_out_MDM2, P21_type, I_type
}
%%
{
    (HMGB1_out,RAGEu_type, rate(k1)),
    (RAGEp_out_PI3Ku,PI3Ku_type, rate(k2)),
    (RAGEp_out_RASu,RASu_type, rate(a1)),
    (PI3Kp_out_PIPu,PIPu_type, rate(k3)),
    (RASp_out_PI3Ku,PI3Ku_type, rate(k2p)),
    (PTEN_out_PIPp,PIPp_type, rate(d3)),
    (PIPp_out_AKTu,AKTu_type, rate(k4)),
    (AKTp_out_MDM2u,MDM2u_type, rate(k8)),
    (MDM2p_out_P53,P53_type, rate(d9p)),
    (MDM2_in_ARF,ARF_out_MDM2, rate(d7p)),
    (MDM2p_in_DNAD,DNAD_type, fhill0),
    (P53_out_DNAD,DNAD_in_P53, fhill10),
    (RASp_out_RAFu,RAFu_type, rate(a2)),
    (RAFp_out_MEKu,MEKu_type, rate(a3)),
    (MEKp_out_ERKu,ERKu_type, rate(a4)),
    (CD_out_RE,RE_in_CD, rate(b7p)),
    (CD_out_RBu,RBu_type, rate(a8)),
    (P21_out_CD,CD_in_P21, rate(b6p)),
    (INK4A_out_CD,CD_in_INK4A, rate(b6pp)),
    (P21_out_CE,CE_in_P21, rate(b12p)),
    (CE_out_RE,RE_in_CE, rate(b7p))
}
```