

Ατομική Διπλωματική Εργασία

**ΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ  
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ  
ΔΙΚΤΥΩΝ ΠΕΤΡΙ**

**Νικόλας Κλεάνθους**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ**



**ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ**

**Μάιος 2012**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ**

**ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ**

**ΤΥΠΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕ  
ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΔΙΚΤΥΩΝ ΠΕΤΡΙ**

**Νικόλας Κλεάνθους**

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

Τα τέσσερα χρόνια των σπουδών μου ήταν για μένα μια ενδιαφέρουσα και συνάμα δύσκολη πρόκληση. Κατέβαλα αρκετή προσπάθεια και κατάφερα να αντεπεξέλθω στις δύσκολες στιγμές, ωστόσο, η παρουσία ανθρώπων γύρω μου που με στήριζαν όλα αυτό το διάστημα ήταν καθοριστική για να φθάσω μέχρι το τέλος. Επί τη ευκαιρία της εκπόνησης της ατομικής διπλωματικής μου εργασίας, που είναι άλλωστε η τελευταία αλλά και η σπουδαιότερη εργασία ενός προπτυχιακού φοιτητή, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου.

Πρωτίστως, ευχαριστώ το Θεό που στήριζε κάθε μου βήμα και που χωρίς τη βοήθεια του καμία επιτυχία δεν θα ήταν δυνατή. Ευχαριστώ ιδιαίτερος την οικογένεια μου για την υπομονή τους, την αγάπη τους και τη συμπαράσταση τους. Ιδιαίτερα, στη μητέρα μου Ξένια, αφιερώνω αυτή την εργασία ως μια ελάχιστη έκφραση ευγνωμοσύνης.

Νοιώθω ακόμη την ανάγκη να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια Δρ. Άννα Φιλίππου για την πολύ καλή συνεργασία και για την καθοδήγηση που μου παρείχε σε κάθε στάδιο της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ τους συμφοιτητές μου για τη φιλία και την αγάπη που μου επέδειξαν καθώς και τους καθηγητές του τμήματος για τις γνώσεις και εμπειρίες που μου μετέδωσαν. Ιδιαίτερος τη συμφοιτήτρια μου Νάταλυ Χοιρίδου για τη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια του έτους.

Νικόλας Κλεάνθους

Μάιος 2012

# Περίληψη

Η επιστήμη της υπολογιστικής βιολογίας κερδίζει διαρκώς περισσότερο έδαφος στον τομέα της ερευνητικής βιολογίας και τούτο διότι ανταποκρίνεται στις ανάγκες της σύγχρονης έρευνας που ζητεί την καλύτερη δυνατή αξιοποίηση της σύγχρονης τεχνολογίας. Στην παρούσα εργασία επιχειρείται η μελέτη μονοπατιών σηματοδότησης που βρίσκονται καθοδικά της πρωτεΐνης HMGB1. Η γονιδιακή έκφραση της πρωτεΐνης HMGB1 έχει βρεθεί σε πολύ υψηλά επίπεδα σε καρκινικά κύτταρα. Στην εργασία εξετάζεται ο ρόλος της πρωτεΐνης στην ανάπτυξη όγκων.

Για την τυπική ανάλυση του συστήματος κατασκευάστηκε ένα μοντέλο δικτύων Πέτρι με στοχαστική επέκταση. Η κατασκευή του μοντέλου βασίστηκε σε προηγούμενη έρευνα. Μοντελοποιήθηκαν τρία σηματοδοτικά μονοπάτια που διεγείρονται από την πρωτεΐνη HMGB1 και τον υποδοχέα της RAGE. Η υπολογιστική προσομοίωση του μοντέλου έδειξε ότι η υπερέκφραση της HMGB1 οδηγεί σε μια θετική επαναληπτική ανάδραση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου καθώς επάγει την έκφραση ογκοπρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες είναι συνήθως μεταλλαγμένες σε καρκινικά κύτταρα επαληθεύτηκε σε ξεχωριστά υπολογιστικά πειράματα. Η αντικαρκινική δραστηριότητα αυτών των πρωτεϊνών βρέθηκε να είναι ιδιαίτερα περιορισμένη.

# Περιεχόμενα

|            |                                                                                  |           |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Κεφάλαιο 1 | <b>Εισαγωγή</b> .....                                                            | <b>1</b>  |
| Κεφάλαιο 2 | <b>Βιολογία Συστημάτων</b> .....                                                 | <b>3</b>  |
| 2.1        | Εισαγωγή στα Βιολογικά Συστήματα                                                 | 3         |
| 2.2        | Βιολογικά Μοντέλα                                                                | 5         |
| 2.3        | Τυπικές μέθοδοι Ανάλυσης Βιολογικών Συστημάτων                                   | 9         |
| 2.4        | Ποσοτική και Ποιοτική Μοντελοποίηση                                              | 11        |
| 2.5        | Τύποι Μοντέλων για Βιολογική Μοντελοποίηση                                       | 12        |
| Κεφάλαιο 3 | <b>Βιολογία Συστημάτων</b> .....                                                 | <b>15</b> |
| 3.1        | Εισαγωγή                                                                         | 15        |
| 3.2        | Βασικές Έννοιες                                                                  | 15        |
| 3.3        | Δομική Ανάλυση των Δικτύων Πέτρι                                                 | 20        |
| 3.4        | Επεκτάσεις Δικτύων Πέτρι                                                         | 27        |
| 3.5        | Αξιολόγηση των Δικτύων Πέτρι                                                     | 37        |
| Κεφάλαιο 4 | <b>Μοντελοέλεγχος για Δίκτυα Πέτρι και</b><br><b>Υπολογιστικά Εργαλεία</b> ..... | <b>41</b> |
| 4.1        | Εισαγωγή στο Μοντελοέλεγχο                                                       | 41        |
| 4.2        | Χρονικές Λογικές                                                                 | 42        |
| 4.3        | Η Γραμμική Χρονική Λογική (LTL)                                                  | 44        |
| 4.4        | Μοντελοέλεγχος στα Δίκτυα Πέτρι                                                  | 46        |
| 4.5        | Η Πιθανολογική Γραμμική Χρονική Λογική (PLTL)                                    | 47        |
| 4.6        | Εργαλεία Λογισμικού για Δίκτυα Πέτρι                                             | 48        |

|                                                |                |
|------------------------------------------------|----------------|
| <b>Κεφάλαιο 5 Το Βιολογικό Μοντέλο .....</b>   | <b>63</b>      |
| 5.1 Εισαγωγή .....                             | 63             |
| 5.2 Μονοπάτια Σηματοδότησης του Μοντέλου ..... | 65             |
| 5.3 Το μοντέλο στο Snoopy .....                | 70             |
| 5.4 Υπολογιστικά Αποτελέσματα .....            | 82             |
| 5.5 Επικύρωση του Μοντέλου .....               | 94             |
| <br><b>Κεφάλαιο 6 Συμπεράσματα .....</b>       | <br><b>98</b>  |
| 6.1 Γενικά Συμπεράσματα .....                  | 98             |
| 6.2 Τελική Ανασκόπηση .....                    | 99             |
| 6.3 Μελλοντική Έρευνα .....                    | 100            |
| <br><b>Βιβλιογραφία.....</b>                   | <br><b>102</b> |
| <br><b>Παράρτημα Α.....</b>                    | <br><b>A-1</b> |

# Κεφάλαιο 1

## Εισαγωγή

Την τελευταία δεκαετία, η βιολογική έρευνα άρχισε να αναζητά νέες ερευνητικές προσεγγίσεις. Η αιτία ήταν ότι οι εξελίξεις στις πειραματικές τεχνολογίες στη βιολογία και την ιατρική είχαν ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός μεγάλου όγκου βιολογικών δεδομένων που αφορούσε κυρίως τις εξαρτήσεις και αλληλοεπιδράσεις πολλών διαφορετικών διεργασιών στο μοριακό επίπεδο του κυττάρου. Οι επιστήμονες αντιλήφθηκαν ότι ήταν πρακτικά αδύνατο με τις υφιστάμενες μεθοδολογίες να προχωρήσουν στην αποτελεσματική αξιολόγηση των βιολογικών δεδομένων. Η επιστήμη της πληροφορικής, ως η επιστήμη που ασχολείται με την αποθήκευση και επεξεργασία των πληροφοριών, κλήθηκε να συνδράμει σε αυτή την προσπάθεια και κατάφερε να συμβάλει δραστικά στον επαναπροσδιορισμό της μεθοδολογίας της έρευνας προάγοντας την επιστημονική πρόοδο. Κλάδοι όπως η Βιοπληροφορική, γεννήθηκαν για να ανταποκριθούν στις προκλήσεις της σύγχρονης ερευνητικής προσπάθειας γεφυρώνοντας το χάσμα μεταξύ της Πληροφορικής και των επιστημών της ζωής.

Αξιοσημείωτη είναι η συνεισφορά των υπολογιστικών βιοεπιστημών στην αντιμετώπιση και διερεύνηση των ανθρώπινων ασθενειών. Έχει εκδοθεί μια πληθώρα δημοσιεύσεων σε αυτή την κατεύθυνση από επιστήμονες σε ολόκληρο τον κόσμο. Οι υπολογιστικές βιοεπιστήμες, στον αγώνα για μια καλύτερη ποιότητα ζωής δεν θα μπορούσαν να αγνοήσουν τη μάχη ενάντια στον καρκίνο. Πράγματι, από τη βιβλιογραφία είναι εμφανές ότι έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την καλύτερη κατανόηση των αιτιών που μπορούν να οδηγήσουν στην ανάπτυξη καρκίνου. Η παρούσα μελέτη αφορμάται από μια τέτοια προσπάθεια. Εξετάζει ορισμένες βιολογικές διαδικασίες, τα λεγόμενα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, φτιάχνοντας ένα υπολογιστικό μοντέλο.

Κύριος σκοπός της μελέτης είναι η μελέτη των τυπικών μεθόδων και οι δυνατότητες που προσφέρουν στην ανάλυση των βιολογικών συστημάτων. Οι τυπικές μέθοδοι αποτελούν μαθηματικές προσεγγίσεις στην ανάλυση συστημάτων. Τα Δίκτυα Πέτρι, είναι ένα μαθηματικό μοντέλο από το χώρο των τυπικών μεθόδων που έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες βιολογικών συστημάτων. Έχουν απλή σημασιολογία και μπορούν να γίνουν εύκολα κατανοητά ακόμα και από άτομα που δεν έχουν καμία σχέση με το αντικείμενο. Έχουν αναπτυχθεί πολλά προγράμματα υπολογιστών με σκοπό την αξιοποίηση των Δικτύων Πέτρι στη μοντελοποίηση συστημάτων.

Η εμφάνιση του καρκίνου στον άνθρωπο είναι το αποτέλεσμα της διαταραχής των ρυθμιστικών οργανισμών που διέπουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο ( απόπτωση ), με μετατόπιση της ισορροπίας πολλαπλασιασμός – θάνατος κυττάρου προς την πλευρά του πολλαπλασιασμού [1]. Το σύστημα ρύθμισης της ισορροπίας πολλαπλασιασμός – θάνατος αποτελείται ουσιαστικά από ρυθμιστικά μόρια από τα οποία ορισμένα έχουν διεγερτική δράση στην κυτταρική διαίρεση ενώ άλλα έχουν κατασταλτική δράση. Η αδυναμία της ομάδας των ογκοκατασταλτικών βιολογικών μορίων να λειτουργήσουν σωστά όταν υποστούν μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα την αρρυθμία του ρυθμιστικού συστήματος προάγοντας τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

Το βιολογικό μοντέλο της παρούσας μελέτης εξετάζει ένα υποσύνολο του ρυθμιστικού συστήματος που είναι υπεύθυνο για την ισορροπία του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και θανάτου. Στην αρχή του πέμπτου κεφαλαίου παρουσιάζεται το βιολογικό σύστημα το οποίο βασίζεται στο [2] και στη συνέχεια παρουσιάζεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την κατασκευή του υπολογιστικού μοντέλου. Ακολουθεί η επαλήθευση του μοντέλου και τα πειράματα που διεξήχθησαν σε αυτό.

# Κεφάλαιο 2

## Βιολογία Συστημάτων

---

|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| 2.1 Εισαγωγή στα Βιολογικά Συστήματα               | 3  |
| 2.2 Βιολογικά Μοντέλα                              | 5  |
| 2.3 Τυπικές μέθοδοι Ανάλυσης Βιολογικών Συστημάτων | 9  |
| 2.4 Ποσοτική και Ποιοτική Μοντελοποίηση            | 11 |
| 2.5 Τύποι Μοντέλων για Βιολογική Μοντελοποίηση     | 12 |

---

### 2.1 Εισαγωγή στα Βιολογικά Συστήματα

Όπως είναι γνωστό, η βιολογία είναι ένας κλάδος που ασχολείται με τη μελέτη όλων των ζωντανών οργανισμών. Η κατανόηση των οργανισμών δεν περιορίζεται σε μεμονωμένες οντότητες αλλά επεκτείνεται στη μελέτη των αλληλεπιδράσεων που έχουν μεταξύ τους στο οργανικό και στο μοριακό επίπεδο. Οι μεμονωμένοι οργανισμοί είναι από μόνοι τους πολύπλοκοι και ο βαθμός πολυπλοκότητας στην έρευνα αυξάνεται όταν ληφθούν υπόψη και οι αλληλεπιδράσεις. Ο κλάδος της βιολογίας που ασχολείται με τη μελέτη αυτών των αλληλεπιδρώντων βιολογικών συστημάτων καλείται βιολογία συστημάτων (systems biology). Έχουν δοθεί αρκετοί ορισμοί για τη βιολογία συστημάτων. Παραθέτουμε ένα που πιστεύουμε πως αποδίδει την ουσία ικανοποιητικά : «Ένα πεδίο έρευνας, που καθοδηγείται από υποθέσεις, και το οποίο κατασκευάζει μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης πολύπλοκων βιολογικών διεργασιών ή οργανικών συστημάτων [3]».

Η εφαρμοσμένη πληροφορική υποστηρίζει την ερευνητική προσπάθεια των επιστημόνων βοηθώντας τους να εκτελέσουν πειράματα που είναι είτε πολύ χρονοβόρα στο εργαστήριο είτε δύσκολα και ακριβά. Η Βιοπληροφορική απο-

τελεί τη διεπαφή, το κοινό σημείο, ανάμεσα στις επιστήμες της Πληροφορικής και της Βιολογίας. Στο ενδιαφέρον άρθρο τους οι Luscombe et al [4] δηλώνουν ότι η «Βιοπληροφορική εμπλέκει την τεχνολογία που χρησιμοποιεί ηλεκτρονικούς υπολογιστές για την αποθήκευση, ανάκτηση, διαχείριση και κατανομή πληροφοριών που σχετίζονται με βιολογικά μακρομόρια όπως DNA, RNA και πρωτεΐνες.»

Πολλοί χρησιμοποιούν τους όρους Βιοπληροφορική και Υπολογιστική Βιολογία (Computational Biology) με τον ίδιο τρόπο ωσάν να μην έχουν καμία διαφορά. Στην ουσία οι όροι διαφέρουν αν και σε κάποιο βαθμό ο ένας καλύπτει τον άλλο [5]. Και οι δυο επιστήμες στηρίζονται στις επιστήμες της ζωής και της θεωρίας υπολογισμού αλλά είναι εμπλουτισμένες και από άλλες επιστήμες όπως μαθηματικά και φυσική. Η Υπολογιστική Βιολογία χρησιμοποιεί μαθηματικές και υπολογιστικές προσεγγίσεις για να απαντήσει θεωρητικές και πειραματικές ερωτήσεις στη βιολογία. Για παράδειγμα βιομηχανικοί που ασχολούνται με την υπολογιστική βιολογία μπορεί να ερευνήσουν τον τρόπο με τον οποίο ρέει το αίμα μέσα στο σώμα φτιάχνοντας ένα μαθηματικό μοντέλο. Από την άλλη η Βιοπληροφορική είναι περισσότερο μηχανική επιστήμη. Εφαρμόζει αρχές της θεωρίας υπολογισμού και τεχνολογίες για να κάνει τα μεγάλα, ποικίλα και πολύπλοκα βιολογικά δεδομένα πιο κατανοητά και χρήσιμα. Για παράδειγμα αξιολογεί τα διάφορα μαθηματικά εργαλεία ως προς την καταλληλότητά τους για βιολογική μοντελοποίηση και αναπτύσσει εφαρμογές και αλγόριθμους που τα υλοποιούν. Συνεπώς και οι δυο επιστήμες έχουν ως κοινό παράγοντα την υπολογιστική δύναμη μόνο που η μία κινείται πιο πολύ κοντά στη βιολογία και η άλλη πιο κοντά στην πληροφορική. Πάντως οι επιστήμονες που ασχολούνται με αυτούς τους τομείς συνήθως ανήκουν και στις δυο περιοχές. Ίσως αυτός να είναι ο λόγος που πολλοί δεν αντιλαμβάνονται ότι μπορεί να υπάρχει κάποια διαφορά. Η παρούσα μελέτη κινείται κάπου μεταξύ των δυο αυτών όρων καθόσον εξετάζει τόσο

τις μεθόδους ανάλυσης των βιολογικών συστημάτων και τις εφαρμόζει στη συνέχεια σε ένα πραγματικό βιολογικό σύστημα.

Επιπρόσθετα ο όρος Βιολογία Συστημάτων, που αναφέρθηκε προηγουμένως, έχει στενή σχέση με τους δύο προηγούμενους και πολλές φορές χρησιμοποιείται και αυτός χωρίς διάκριση. Στην ουσία ο όρος Βιολογία Συστημάτων χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα διεπιστημονικό πεδίο έρευνας στη βιολογία και οι Vladimir et al. έχουν κάνει μια προσπάθεια αποσαφήνισης του όρου στο [6]. Υποστηρίζουν ότι αν και ο όρος άρχισε να χρησιμοποιείται τα τελευταία δέκα χρόνια, η θεωρία συστημάτων κατασκευάστηκε και εφαρμόστηκε στη βιολογία στα τέλη της δεκαετίας του 60. Το γεγονός ότι επικαλύπτει πολλές περιοχές έρευνας της γενετικής καθιστά δύσκολο τον ακριβή ορισμό της. Δεν υπάρχει κάποιος ορισμός που να είναι καθολικά αποδεκτός. Παρά ταύτα κάθε ορισμός στηρίζεται στις αντιδράσεις μεταξύ των αντικειμένων που συνιστούν του βιολογικό σύστημα. Έχει ακόμη λεχθεί ότι η Βιολογία Συστημάτων είναι μια προσέγγιση παρά ένας παραδοσιακός επιστημονικός τομέας. Έτσι ο όρος Βιολογία Συστημάτων προσεγγίζει περισσότερο την έννοια της Υπολογιστικής Βιολογίας παρά της Βιοπληροφορικής αν και δεν προϋποθέτει τη χρήση υπολογιστικών τεχνικών στην έρευνα.

## 2.2 Βιολογικά Μοντέλα

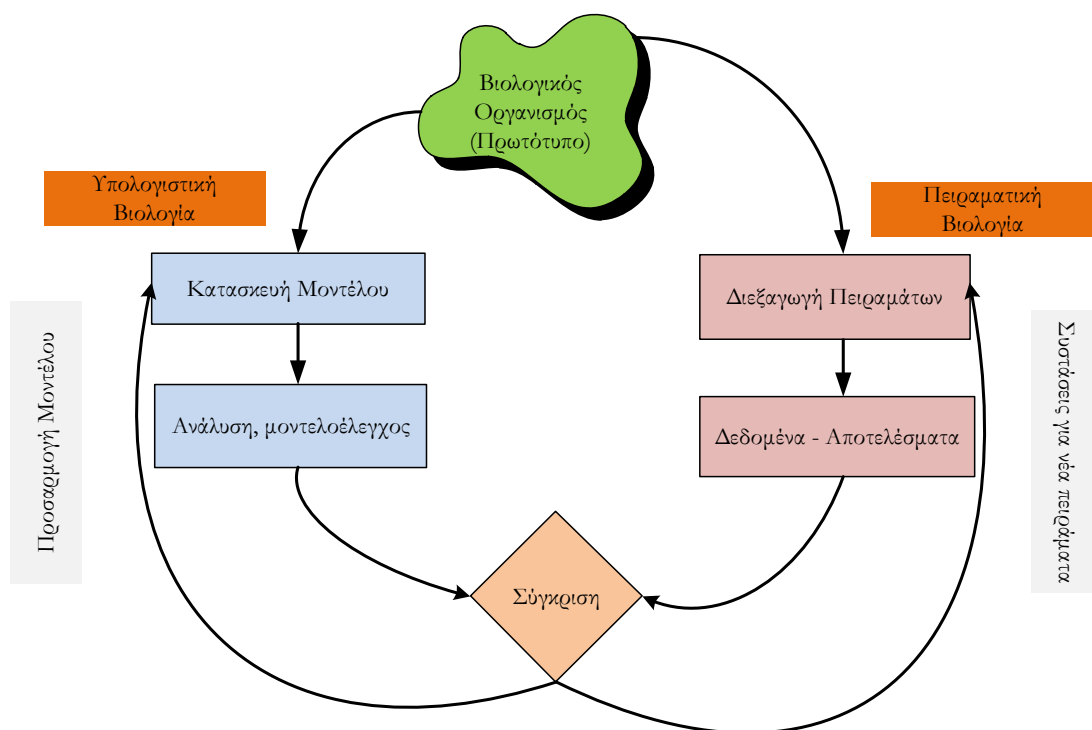
Η λέξη μοντέλο, που προέρχεται από την αντίστοιχη ιταλική λέξη *modello*, έχει διάφορες ερμηνείες. Στις θετικές επιστήμες, ένα μοντέλο είναι μια κατασκευή που φτιάχνεται από έναν ερευνητή και παριστάνει κάτι που είτε έχει υλική υπόσταση είτε αφηρημένη έννοια. Έτσι έχουμε για παράδειγμα μοντέλα στις επιστήμες των οικονομικών και διοίκησης που παριστάνουν οικονομικές και διοικητικές διεργασίες υπό τη μορφή ροών εργασίας κτλ. Στους τομείς των μαθηματικών και των θεωρητικών επιστημών τα μοντέλα συνήθως απεικονίζουν λει-

τουργίες που προέρχονται από τον φυσικό κόσμο όπως για παράδειγμα στη Μετεωρολογία όπου μοντέλα που προσομοιώνουν τις αλλαγές του καιρού χρησιμοποιούνται για τη μετεωρολογική πρόβλεψη. Επιπλέον, τα μοντέλα δύνανται να διακριθούν ως προς τη φύση τους. Για παράδειγμα, μια κατηγορία αρκετά διαδεδομένη που χρησιμοποιείται και στην παρούσα μελέτη είναι τα μαθηματικά μοντέλα. Στη βιολογία χρησιμοποιούνται οργανισμοί και μικρά ζώα ως αντιπρόσωποι άλλων οργανισμών αν και σε αυτή την περίπτωση δεν πρόκειται για ανθρώπινο κατασκευάσμα αλλά για ένα φυσικό οργανισμό. Οι αρχιτέκτονες δημιουργούν μοντέλα (μακέτες) για να βοηθήσουν τον πελάτη να αντιληφθεί καλύτερα πως θα είναι το τελικό αποτέλεσμα.

Η αξία των μοντέλων είναι πολύ σημαντική και αυτό οφείλεται στα πολλά πλεονεκτήματα που επιφέρουν στην έρευνα. Κατ' αρχάς η κατασκευή ενός μοντέλου απαιτεί καλή κατανόηση της συμπεριφοράς του πρωτοτύπου. Έτσι ο δημιουργός επιδιώκει μεγαλύτερη κατανόηση του πρωτοτύπου προκειμένου να καταλήξει σε κάτι που να ανταποκρίνεται στην πραγματικότητα. Η όλη διαδικασία δημιουργίας του συνεπώς, συμβάλλει στην εκβάθυνση της γνώσης που έχουμε για το πρωτότυπο.

Στην υπολογιστική βιολογία, η σύνηθες πρακτική είναι η ομάδα ανάπτυξης του μοντέλου να βρίσκεται σε συνεννόηση με μια ομάδα πειραματικών βιολόγων. Και οι δύο ομάδες έχουν ένα κοινό στόχο : τη μελέτη ενός βιολογικού οργανισμού ή διεργασίας. Στην εικόνα 2.2.1 παρουσιάζεται η διαδικασία ανάπτυξης ενός μοντέλου. Τόσο η διαδικασία μοντελοποίησης όσο και τα πειράματα του εργαστηρίου έχουν ως αφετηρία τη βασική κατανόηση του βιολογικού οργανισμού από όπου θα ληφθούν τα δεδομένα. Τα δεδομένα μπορούν να ληφθούν, πέραν από την άμεση μελέτη του οργανισμού, από την επιστημονική βιβλιογραφία και από εξειδικευμένες βάσεις δεδομένων. Συνήθως, ένα μοντέλο που βρίσκεται στα πρώιμα στάδια της κατασκευής του απέχει πολύ από την πραγματικότητα. Μέσα από διαδικασίες ανάλυσης και μοντελοελέγχου, για τα οποία θα γίνει

λόγος σε επόμενο κεφάλαιο, η ομάδα ανάπτυξης μπορεί να αξιολογήσει την ορθότητα του μοντέλου και να εξακριβώσει εάν πραγματικά ανταποκρίνεται στο πρωτότυπο. Αυτό επιτυγχάνεται δια μέσου της σύγκρισης και αντιπαράβολής των προσομοιώσεων του μοντέλου με τα πειραματικά αποτελέσματα. Σε πρώτο στάδιο επιδιώκεται η εναρμόνιση της λειτουργίας του μοντέλου με τα πειραματικά δεδομένα και αποκλίσεις στη σύγκριση αποδίδονται στο υπολογιστικό μοντέλο. Αφού όμως η ομάδα ανάπτυξης βεβαιωθεί για την ορθότητα του μοντέλου ξεκινά μια διαδικασία πειραματικών προσομοιώσεων στο υπολογιστικό μοντέλο τα οποία η πειραματική βιολογία θα κληθεί να επιβεβαιώσει στο εργαστήριο. Έτσι σε αυτή τη φάση το υπολογιστικό μοντέλο λαμβάνει σημαίνοντα ρόλο χωρίς ωστόσο να σημαίνει ότι είναι ελεύθερο από λάθη τα οποία διέφυγαν της ομάδας ανάπτυξης.



**Εικόνα 2.2.1 :** Η ανάπτυξη ενός μοντέλο είναι μια επαναληπτική διαδικασία και βασίζεται στη συνεργασία υπολογιστικής και πειραματικής βιολογίας

Επιπρόσθετα, το μοντέλο δίδει μεγαλύτερη ευελιξία όσον αφορά τη διεξαγωγή πειραμάτων. Για παράδειγμα, στην παρούσα μελέτη, μπορέσαμε αφού συντάξαμε το μοντέλο να διενεργήσουμε πειράματα σχετικά εύκολα με τη βοήθεια του υπολογιστή. Από την άλλη, στο εργαστήριο τα πειράματα σίγουρα θα χρειάζονταν πολύ περισσότερο χρόνο για να ολοκληρωθούν. Ο χρόνος είναι λοιπόν ένα άλλο πλεονέκτημα της μοντελοποίησης. Το κόστος επίσης είναι ένας αποτρεπτικός παράγοντας για τη διεξαγωγή ρεαλιστικών πειραμάτων. Η ανάλυση και ο πειραματισμός σε μοντέλα δεν επιβαρύνει τον ερευνητή με οικονομικό κόστος αλλά μάλλον τον ωφελεί αν συμπεριλάβουμε τις περιπτώσεις εκείνες όπου η μοντελοποίηση πριν από την κατασκευή του πρωτοτύπου για εντοπισμό λαθών μπορεί να προλάβει μια τεράστια οικονομική ζημιά.

Η ανάγκη για την ανάλυση μοντέλων οδήγησε στην εφεύρεση εξειδικευμένων γλωσσών και φορμαλισμών με απώτερο σκοπό τη θεμελίωση κοινής πρακτικής. Ένα διεθνές αποδεκτό σύστημα βοηθά στην κατανόηση των μοντέλων από άλλους ερευνητές οι οποίοι μπορούν να συμβάλουν στη βελτίωση του είτε επεκτείνοντας το είτε προτείνοντας διορθώσεις. Ένα νέο μοντέλο πρέπει να περιγραφεί με βάση μια από τις τυπικές σημασιολογίες μοντελοποίησης. Ωστόσο αυτό δεν είναι πάντοτε εύκολο, ιδιαίτερα για τα βιολογικά μοντέλα λόγω του χάσματος του τρόπου σκέψης και αντίληψης των βιολόγων και των μαθηματικών ή των σχετιζομένων με την πληροφορική. Επιπρόσθετα η περιορισμένη βιολογική μας γνώση είναι ακόμη ένα τροχοπέδη. Ακόμη και στο επίπεδο του κυττάρου η γνώση μας δεν είναι πλήρης. Συνεπώς τα μοντέλα καλύπτονται συχνά από ένα βαθμό αβεβαιότητας. Το μοντέλο που παρουσιάζεται στο πέμπτο κεφάλαιο έχει ένα βαθμό αβεβαιότητας που οφείλεται στην έλλειψη επαρκούς γνώσης σχετικά με το ρυθμό αντιδράσεων στο κύτταρο. Παρά ταύτα η μοντελοποίηση είναι δυνατή κάτω από αυτές τις συνθήκες και όπως δείχνουν τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων το μοντέλο έχει ικανοποιητική ανταπόκριση στα πειραματικά αποτελέσ-

ματα. Στην ενότητα που ακολουθεί παρουσιάζεται η προσέγγιση ανάλυσης συστημάτων υπό την σκιοπιά της επιστήμης της Πληροφορικής.

### 2.3 Τυπικές Μέθοδοι Ανάλυσης Βιολογικών Συστημάτων

Η ανάγκη για επαλήθευση συστημάτων είναι αριστά εδραιωμένη στο χώρο της Πληροφορικής. Τα συστήματα λογισμικού και υπολογιστικού υλικού ολοένα πληθαίνουν και γίνονται όλο και πιο περίπλοκα. Το κόστος ενός λάθους μπορεί να μεταφραστεί σε μεγάλη οικονομική απώλεια. Επιπρόσθετα, η εισροή των υπολογιστικών συστημάτων στην καθημερινή μας ζωή η οποία μπορεί να έχει ζωτικές διαστάσεις για μια κοινωνία επιβάλλουν τον έλεγχο για ορθότητα και ασφάλεια. Η προσέγγιση της Πληροφορικής και ιδιαίτερα της Τεχνολογίας Λογισμικού στην ανάλυση συστημάτων ονομάζεται τυπική ανάλυση ή τυπικές μέθοδοι. Οι τυπικές μέθοδοι είναι γλώσσες, τεχνικές, και εργαλεία που βασίζονται στα μαθηματικά με σκοπό την προδιαγραφή και την επαλήθευση συστημάτων [7].

Η προδιαγραφή των συστημάτων γίνεται μέσω μαθηματικών γλωσσών, δηλαδή γλωσσικών εκφράσεων με μαθηματικό υπόβαθρο η οποία έχει μια καθορισμένη σύνταξη και σημασιολογία. Με την εξειδικευμένη γλώσσα μπορεί να γίνει η περιγραφή του συστήματος. Υπάρχουν πάρα πολλοί τρόποι που μπορεί κάποιος να χρησιμοποιήσει για να περιγράψει ένα σύστημα. Η γνώση των ιδιοτήτων, πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων είναι τα κριτήρια βάση των οποίων θα γίνει η επιλογή για ένα σύστημα. Κάποιες γλώσσες είναι καλύτερες για κάποια συστήματα από άλλες. Ωστόσο στην τυπική ανάλυση είναι δυνατή η χρήση διαφορετικών γλωσσών ταυτόχρονα για ένα σύστημα και έτσι διαφορετικές προοπτικές ενός συστήματος μπορούν να καθοριστούν καλύτερα.

Οι τυπικές μέθοδοι ξεκινούν από την προδιαγραφή για να φτάσουν στην επαλήθευση του συστήματος που είναι άλλωστε και ο τελικός σκοπός. Ο μοντελοέλεγχος είναι μια τεχνική επαλήθευσης συστημάτων. Για την εφαρμογή του

χρειάζεται η προδιαγραφή μέσω τυπικών μεθόδων, ενός πεπερασμένου συστήματος. Χρησιμοποιώντας την ίδια γλώσσα προδιαγραφής μπορούν να περιγραφούν ιδιότητες για το σύστημα. Έχοντας το σύστημα από τη μια και τις ιδιότητες από την άλλη, ειδικοί αλγόριθμοι αποφαινόμενοι εάν οι ιδιότητες επαληθεύονται ή όχι στο σύστημα. Ο λειτουργία του στηρίζεται στη διερεύνηση όλων των δυνατών καταστάσεων που μπορεί να βρεθεί ένα σύστημα. Περισσότερα για το μοντελοέλεγχο αναφέρονται στο τέταρτο κεφάλαιο.

Μία άλλη μέθοδος επαλήθευσης συστημάτων μέσω τυπικής ανάλυσης είναι η απόδειξη θεωρημάτων. Σε αυτή τη μέθοδο το σύστημα και οι ιδιότητες προς έλεγχο ορίζονται ως τύποι σε κάποια μαθηματική λογική. Η μαθηματική λογική αποτελεί ένα τυπικό σύστημα που περιλαμβάνει σύνολα αξιωμάτων και συμπερασματικών κανόνων. Ξεκινώντας από τους αξιωματικούς τύπους η μέθοδος απόδειξης θεωρημάτων επιχειρεί μέσω των κανόνων συμπερασμού να φθάσει σε ιδιότητες που επαληθεύονται στο σύστημα. Είναι μια εργασία που μπορεί να γίνει και με τη βοήθεια υπολογιστών και κάποιες προσεγγίσεις είναι πλήρως αυτοματοποιημένες. Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου, ως προς το μοντελοέλεγχο, είναι ότι μπορεί να χειριστεί συστήματα με απεριόριστο αριθμό καταστάσεων.

Η μοντελοποίηση και η ανάλυση συστημάτων με χρήση τυπικών μεθόδων δύναται να διακριθεί σε δύο κατηγορίες ως προς το είδος των μοντέλων [8]. Η μια κατηγορία είναι τα καθαρά μαθηματικά μοντέλα τα οποία είναι γραμμένα με μαθηματικές σχέσεις ( π.χ. διαφορικές εξισώσεις ) οι οποίες συσχετίζουν ποσότητες οντοτήτων. Τα μαθηματικά μοντέλα στηρίζονται σε συναρτήσεις μεταφοράς, δηλαδή συναρτήσεις που συσχετίζουν τις διάφορες αριθμητικές ποσότητες, και σχηματίζουν ένα δίκτυο αλληλοεξαρτώμενων ποσοτήτων. Η μαθηματική ανάλυση των μοντέλων είναι δυνατή όταν οι περιορισμοί των συναρτήσεων μεταφοράς είναι σχετικά απλοί. Εάν οι συναρτήσεις είναι περίπλοκες ( μη γραμμικές ή στο-

χαστικές διαφορικές εξισώσεις) τότε η μαθηματική ανάλυση δεν είναι πρακτική και αντί αυτής εφαρμόζεται προσομοίωση σε υπολογιστές.

Η άλλη κατηγορία είναι τα υπολογιστικά μοντέλα το οποία έχουν μεν ένα μαθηματικό υπόβαθρο αλλά περιγράφονται με ένα πολύ διαφορετικό τρόπο ο οποίος επιτρέπει διαφορετική προσέγγιση. Ο πυρήνας των υπολογιστικών μοντέλων είναι το σύνολο καταστάσεων, δηλαδή οι καταστάσεις που μπορεί να βρεθεί το σύστημα εάν αυτό τεθεί σε λειτουργία. Τα υπολογιστικά μοντέλα αποτελούνται από σύνολα αντικειμένων και κανόνες αλληλεπίδρασης μεταξύ αυτών. Για παράδειγμα στα βιολογικά υπολογιστικά μοντέλα οι οντότητες είναι βιολογικού τύπου, όπως για παράδειγμα κύτταρα και αλληλεπιδράσεις μεταξύ των. Και αυτά τα μοντέλα μπορούν να αναλυθούν με μαθηματικές μεθοδολογίες αν και η πολυπλοκότητα τους μπορεί να αποτρέψει αυτή την προοπτική. Στο [8] οι Fisher και Henzinger αντιπαράβλουν τις δυνατότητες των δυο κατηγοριών. Οι συγγραφείς συμπεραίνουν ότι τα υπολογιστικά μοντέλα είναι περισσότερο πρακτικά για μοντελοποίηση συστημάτων και στηρίζουν τη θέση τους κυρίως στο γεγονός ότι η περιγραφή τους είναι σε άμεση αντιστοιχία με την υπολογιστική υλοποίηση. Αντιθέτως τα μαθηματικά μοντέλα δεν έχουν άμεση αντιστοιχία με την υλοποίηση και απαιτούν επομένως ένα επιπλέον επίπεδο αντιστοιχίας. Πάντως και για τις δύο κατηγορίες χρειάζεται ο ορισμός της ερμηνείας τους ως προς το βιολογικό σύστημα το οποίο παριστάνουν.

## **2.4 Ποσοτική και Ποιοτική Μοντελοποίηση**

Ένα βιολογικό μοντέλο είναι μια αφαιρετική απεικόνιση του πραγματικού συστήματος. Ο βαθμός της επιθυμητής αφαιρετικότητας καθορίζει και το είδος της ανάλυσης που θα ακολουθήσει η οποία μπορεί να είναι είτε ποσοτική είτε ποιοτική είτε ένας συνδυασμός των δύο.

Στην ποσοτική ανάλυση μας ενδιαφέρει η λεπτομερής λειτουργία του οργανισμού. Στο μοντέλο εισάγονται ποσοτικές πληροφορίες που αφορούν τις συ-

τατικές οντότητες όπως είναι για παράδειγμα τα επίπεδα συγκέντρωσης των οντοτήτων και οι ρυθμοί αλληλεπίδρασης που έχουν μεταξύ τους. Το πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι η εξαγωγή ακριβέστερων αποτελεσμάτων εφόσον το μοντέλο είναι κατά το δυνατό μια ρεαλιστική απεικόνιση του συστήματος. Εντούτοις, η κατασκευή ποσοτικών μοντέλων είναι ένα δύσκολο εγχείρημα. Οι ποσοτικές λεπτομέρειες είναι δύσκολο να εξαχθούν και πολλές φορές μας είναι άγνωστες. Επιπρόσθετα, τα ποσοτικά μοντέλα έχουν αυξημένη πολυπλοκότητα και καθιστούν δύσκολη την ανάλυση ιδιαίτερα όταν ο βαθμός αλληλεξάρτησης των μεγθών πληθαίνει.

Η ποιοτική ανάλυση από την άλλη επιχειρεί μια περισσότερο αφαιρετική προσέγγιση χωρίς να επιβαρύνει την ανάλυση του μοντέλου. Στα ποιοτικά μοντέλα δεν εισάγονται ποσοτικές πληροφορίες παρὰ μόνο σχεδιάζεται μια αφαιρετική δομή η οποία περιέχει τις οντότητες και τις σχέσεις μεταξύ τους. Σε αντίθεση με την ποιοτική ανάλυση, επιτρέπει τη μοντελοποίηση συστημάτων, από τα οποία απουσιάζει ακριβής γνώση για τη λειτουργία τους, σε πολλά αφαιρετικά επίπεδα. Ωστόσο, τα αποτελέσματα ανάλυσης ενδέχεται να μην είναι ακριβή αν και η δυνατότητα μη ντετερμινιστικής ανάλυσης σε ποιοτικά βιολογικά μοντέλα στη βιβλιογραφία έχει ενθαρρυντικά αποτελέσματα καθόσον τα βιολογικά συστήματα λειτουργούν με αυτό τον μη ντετερμινιστικό τρόπο.

## **2.5 Τύποι μοντέλων για βιολογική μοντελοποίηση**

Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται συνοπτικά τυπικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρέως στη μοντελοποίηση βιολογικών συστημάτων. Εξαιρούνται τα Δίκτυα Πέτρι για τα οποία γίνεται εκτενής λόγος στο επόμενο κεφάλαιο.

### **2.5.1 Δυαδικά Δίκτυα**

Τα δυαδικά δίκτυα (Boolean Networks) είναι η παλαιότερη μορφή τυπικών μεθόδων στη μοντελοποίηση βιολογικών συστημάτων. Προτάθηκαν από τον Kauffman στις αρχές του 1970 στο [9]. Οι οντότητες σε ένα τέτοιο δίκτυο ανα-

παριστούν ένα βιολογικό μόριο και μπορούν να έχουν μόνο δύο καταστάσεις : ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση, εξού και η ονομασία τους ως Boolean. Η κατάσταση του συστήματος καθορίζεται από το σύνολο των καταστάσεων των συστατικών οντοτήτων και εφόσον η λειτουργικότητα του αφορά τις καταστάσεις από τις οποίες διέρχεται τα δίκτυα Boolean κατατάσσονται στα υπολογιστικά μοντέλα. Η κατάσταση κάθε οντότητας για κάθε επόμενο βήμα είναι ενεργή εάν το σύνολο των παραγόντων ενεργοποίησης της οντότητας είναι μεγαλύτερο από το σύνολο των παραγόντων καταστολής ενώ είναι ανενεργή σε αντίθετη περίπτωση.

### **2.5.2 Αλληλοεπηρεαζόμενες Μηχανές Καταστάσεων**

Τα μοντέλα μηχανών καταστάσεων (state machine models) κατασκευάζονται με γνώμονα τις καταστάσεις στις οποίες μπορεί να βρεθεί ο πραγματικός οργανισμός. Οι καταστάσεις μπορούν να έχουν ένα βαθμό αφαιρετικότητας ως προς τις πραγματικές διεργασίες του οργανισμού. Οι αλληλοεπηρεαζόμενες μηχανές καταστάσεων ( interacting state machines ) περιγράφουν τον τρόπο με τον οποίο οντότητες – μοντέλα ενός ευρύτερου μοντέλου επηρεάζει το ένα το άλλο. Ο ορισμός υπομοντέλων ανταποκρίνεται στη μορφή ενός βιολογικού συστήματος που δεν είναι άλλος από ένα συγκρότημα βιολογικών οντοτήτων τα οποία αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν μια μεγαλύτερη οντότητα. Σε αντίθεση με τα δίκτυα Boolean είναι εκ της φύσεως τους ιεραρχικά. Έτσι η κατάσταση του συστήματος εξαρτάται από τις καταστάσεις των συστατικών στοιχείων. Ένα πλήθος αλλαγών καταστάσεων στις οντότητες κατώτερων επιπέδων προκαλούν μια αλλαγή κατάστασης στο υψηλότερο επίπεδο παρέχοντας έτσι μια περισσότερη αφαιρετική οπτική του συστήματος.

### **2.5.3 Άλγεβρες Διεργασιών**

Σε αντίθεση με τις δυο προηγούμενες μεθόδους οι άλγεβρες διεργασιών (process algebra) εστιάζονται στη σημασία των αντιδράσεων μεταξύ των βιολογικών μορίων ως την κύρια αιτία της υπάρξεως των βιολογικών διεργασιών. Η

λειτουργία ενός μοντέλου γραμμένο στη γλώσσα της άλγεβρας διεργασιών ορίζεται διαμέσου μιας αλληλουχίας γεγονότων. Κάθε μόριο σχετίζεται με μια διαδικασία και πολλά αντίγραφα της ίδιας διαδικασίας τρέχουν παράλληλα προσομοιώνοντας έτσι πολλά μόρια. Η επικοινωνία μεταξύ δύο διαδικασιών με κανάλια χρησιμοποιείται για να μοντελοποιήσει τις αντιδράσεις που προκαλούνται μεταξύ δυο μορίων συσχετίζοντας ένα γεγονός με την αλλαγή της κατάστασης εκείνου του μορίου. Πέρα από τη βασική σημασιολογία υπάρχει μια ποικιλία παραλλαγών που επιτρέπουν πιο εξειδικευμένη μοντελοποίηση όπως για παράδειγμα στοχαστική συμπεριφορά και ανάπτυξη βιολογικών μοντέλων.

### **2.5.5 Υβριδικά Μοντέλα**

Τα υβριδικά μοντέλα επιχειρούν να γεφυρώσουν την απόσταση που διαχωρίζει τα μαθηματικά από τα υπολογιστικά μοντέλα αντλώντας χαρακτηριστικά και από τις δύο προσεγγίσεις και προτείνοντας ένα κοινό πλαίσιο. Για να το πετύχουν αυτό επιτρέπουν τη συνύπαρξη, στο ίδιο μοντέλο, μεταβλητών που ανήκουν είτε σε ένα διακριτικό εύρος είτε σε ένα συνεχές εύρος. Οι διακριτές μεταβλητές ρυθμίζονται από αλλαγές διακριτών καταστάσεων ενώ οι συνεχείς μεταβλητές από διαφορικές εξισώσεις. Το άθροισμα όλων των διακριτών μεταβλητών καθορίζει τη διακριτή κατάσταση του συστήματος και η διακριτή κατάσταση με τη σειρά της καθορίζει ποιές διαφορικές εξισώσεις θα χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο των ρυθμών μεταβολής των συνεχών μεταβλητών. Τα υβριδικά μοντέλα κρίνονται ιδανικά για την μοντελοποίηση βιολογικών συστημάτων όπου η σχέση μεταξύ των οντοτήτων μεταβάλλεται με τον χρόνο.

# Κεφάλαιο 3

## Δίκτυα Πέτρι

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 3.1 Εισαγωγή                         | 15 |
| 3.2 Βασικές Έννοιες                  | 15 |
| 3.3 Δομική Ανάλυση των Δικτύων Πέτρι | 20 |
| 3.4 Επεκτάσεις Δικτύων Πέτρι         | 27 |
| 3.5 Αξιολόγηση των Δικτύων Πέτρι     | 37 |

### 3.1 Εισαγωγή

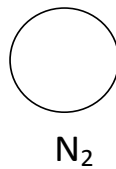
Σε αυτό το κεφάλαιο θα μελετήσουμε τα Δίκτυα Πέτρι (Petri Nets), ένα γραφικό μαθηματικό εργαλείο. Θα μελετήσουμε τη δομή, τις ιδιότητες και τις χρήσεις του στο χώρο της μοντελοποίησης βιολογικών συστημάτων. Ο εφευρέτης των Δικτύων Πέτρι θεωρείται ο Γερμανός Alan Adam Petri, ο οποίος εφάρμοζε το σχεδιασμό και τη σημασιολογία τους στην ηλικία των 13 χρόνων για να περιγράψει χημικές διεργασίες [10]. Παρουσιάστηκαν για πρώτη φορά επισήμως στο [11]. Τα Δίκτυα Πέτρι χρησιμοποιούνται κυρίως σε συστήματα ταυτοχρονίας και κατανεμημένα συστήματα.

### 3.2 Βασικές Έννοιες

Ένα Δίκτυο Πέτρι (ΔΠ) είναι ένα είδος γραφήματος όπου στη θέση των κόμβων έχουμε τις θέσεις (places). Αυτές, μπορεί να έχουν διαφορετική σημασία ανάλογα με τη σημασία που τους δίδει ο δημιουργός του μοντέλου και το σύστημα προς μοντελοποίηση. Έτσι, σε ένα δίκτυο υπολογιστών οι θέσεις αναπαριστούν τους υπολογιστές, σε ένα βιολογικό σύστημα τις βιολογικές ουσίες, σε μια επιχειρησιακή διαδικασία τις διάφορες φάσεις της κ.ο.κ. Ωστόσο, μια θέση δεν αντιστοιχεί κατ' ανάγκη σε μια αδιάσπαστη οντότητα αλλά μπορεί να συμβολίζει

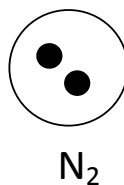
ένα πλήθος στοιχείων. Εδώ προκύπτει και η έννοια της αφαιρετικότητας του μοντέλου, σε πόση λεπτομέρεια δηλαδή και σε πόσο βάθος ανταποκρίνεται το μοντέλο στην πραγματικότητα. Δεν υπάρχει κάποιος κανόνας για το τι αναπαριστά μια θέση· ο δημιουργός δίδει τη σημασιολογία που πιστεύει ότι τον βοηθά καλύτερα για να φθάσει στο στόχο του.

Μια θέση αναπαρίσταται με ένα κύκλο όπου στο κάτω μέρος αναγράφεται ένα αναγνωριστικό όνομα :



**Εικόνα 3.1.1** Θέση που απεικονίζει άζωτο

Η δυναμικότητα του μοντέλου στηρίζεται στις μάρκες (tokens<sup>1</sup>). Οι μάρκες τοποθετούνται μόνο πάνω στις θέσεις και δηλώνουν την ύπαρξη ποσοτήτων. Μια θέση μπορεί να έχει απεριόριστο αριθμό από μάρκες. Συνήθως αναπαριστούμε γραφικά μόνο συγκεντρώσεις από μία μέχρι τρεις μάρκες. Έτσι στην παρουσία δυο μορίων αζώτου έχουμε:



**Εικόνα 3.1.2** Αναπαράσταση δυο μορίων αζώτου

Ένα άλλο βασικό δομικό στοιχείο είναι οι μεταβάσεις. Οι μεταβάσεις κυρίως έχουν ρόλο ενεργοποίησης μιας διαδικασίας. Οι θέσεις δεν μπορούν να

---

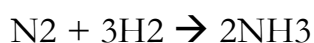
<sup>1</sup> Στην ελληνική βιβλιογραφία συναντάται ως : σημείο ή ένδειγμα ή κουπόνι ή πεσσός ή μάρκα. Από εδώ και στο εξής θα χρησιμοποιείται η λέξη μάρκα

συνδεθούν άμεσα μεταξύ τους, όπως συμβαίνει σε ένα γράφο αλλά συνδέονται δια μέσου μιας μετάβασης.

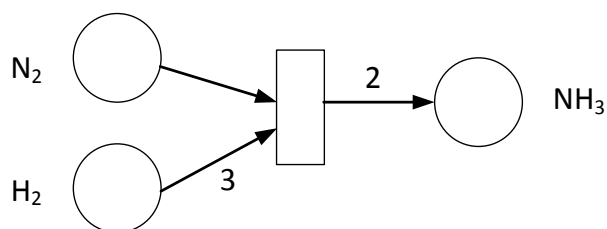


**Εικόνα 3.1.3 :** Σύμβολο μετάβασης. Μια μετάβαση μπορεί να έχει ένα όνομα, όπως εδώ “T”, ή μια περιγραφή στο κάτω μέρος.

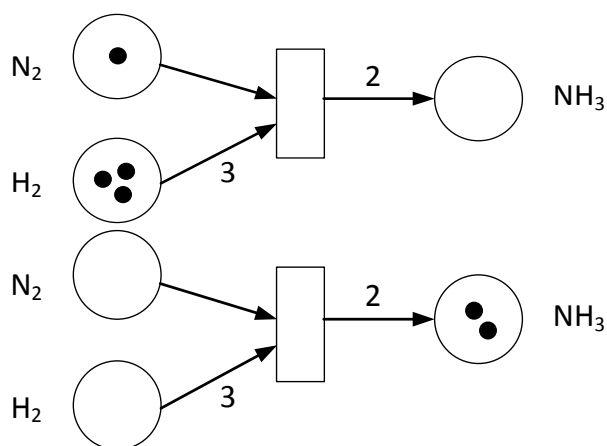
Οι μεταβάσεις, παρέχουν μεγαλύτερο έλεγχο στον τρόπο με τον οποίο θα διαζαχθεί μια διαδικασία. Έτσι ας πάρουμε για παράδειγμα μια χημική αντίδραση για την παραγωγή αμμωνίας :



Για την απεικόνιση σε ΔΠ χρειαζόμαστε τρεις θέσεις, μία για κάθε ουσία, και μια μετάβαση. Η αντίδραση μπορεί να ενεργοποιηθεί μόνον εφόσον υπάρχει τουλάχιστον ένα μόριο  $\text{N}_2$  και τρία  $\text{H}_2$ . Αυτός είναι ο βασικός κανόνας ενεργοποίησης των μεταβάσεων σε ένα ΔΠ. Όταν ολοκληρωθεί η αντίδραση θα παραχθούν δυο μόρια  $\text{NH}_3$ . Στην εικόνα 3.1.3 παρουσιάζεται το αρχικό δίκτυο και στην εικόνα 3.1.4 η κατάσταση πριν και μετά από την πυροδότηση της μετάβασης. Σε κάθε ακμή που συνδέει μια θέση με μια μετάβαση τοποθετούμε έναν αριθμό που δηλώνει τον ελάχιστο αριθμό μαρκών που απαιτείται για την ενεργοποίηση της μετάβασης. Τοποθετούμε επίσης έναν αντίστοιχο αριθμό στις ακμές που ξεκινούν από μια μετάβαση προς μια θέση για να δηλώσουμε τον αριθμό των μαρκών που θα παραχθούν αφού γίνει η αντίδραση. Ακμές χωρίς κάποιο αριθμό, θεωρούνται ακμές με βάρος ένα.



**Εικόνα 3.1.3 :** Ένα απλό δίκτυο Πέτρι που παριστάνει την εξίσωση  $N_2 + 3H_2 \rightarrow 2NH_3$

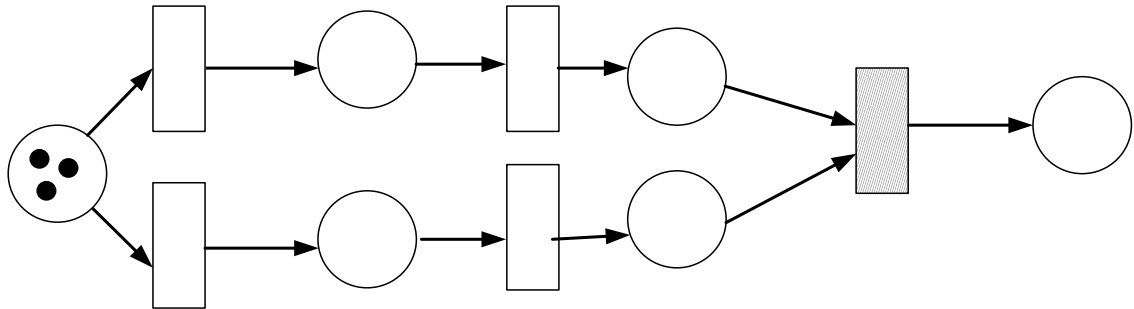


**Εικόνα 3.1.4 :** Διαδικασία πυροδότησης του παραπάνω δικτύου

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη ενεργοποίηση μιας μετάβασης και κατ' επένταση τη διεξαγωγή της αντίδρασης είναι όλες οι θέσεις εισόδου να έχουν αριθμό μαρκών μεγαλύτερο ή ίσο από το βάρος των ακμών που τα συνδέει. Έτσι στο παραπάνω παράδειγμα εάν η  $H_2$  είχε δύο αντί τρεις μάρκες τότε η αντίδραση δεν θα μπορούσε να συμβεί.

Όπως έχει προαναφερθεί, τα Δίκτυα Πέτρι είναι πολύ χρήσιμα στη μοντελοποίηση συστημάτων ταυτοχρονίας. Στην εικόνα 3.1.5 βλέπουμε ένα σχετικό παράδειγμα. Έστω ότι τα δυο μονοπάτια που φαίνονται στο σχήμα αναπαριστούν δυο εργασίες. Η τελευταία μετάβαση (που είναι σκιασμένη) αναπαριστά ένα βήμα που απαιτεί ταυτοχρονία. Έτσι εάν κάποια εργασία τελειώσει νωρίτερα από την άλλη τότε το μονοπάτι της σταματά μέχρι να τελειώσει και η άλλη. Ένα άλλο φαινόμενο που φαίνεται στην ίδια εικόνα είναι η δυνατότητα επιλογής. Η α-

ριστερότερη θέση μπορεί να ενεργοποιήσει δυο μεταβάσεις κατ' επιλογή. Η επιλογή γίνεται συνήθως τυχαία αν και μπορούμε να επέμβουμε στον τρόπο επιλογής με διάφορους τρόπους όπως για παράδειγμα ορίζοντας πιθανότητες.



**Εικόνα 3.1.5** Τα δίκτυα Πέτρι χρησιμοποιούνται σε προβλήματα ταυτοχρονίας και καταναεμημένου υπολογισμού.

Η κατανομή των μάρκων στις θέσεις ενός μοντέλου καλείται μαρκάρισμα (marking). Στην εικόνα 3.1.5 παρουσιάζεται το αρχικό μαρκάρισμα. Το αρχικό μαρκάρισμα,  $m_0$ , καθορίζεται από το δημιουργό του μοντέλου με σκοπό να αντανακλά την αρχική κατάσταση του πρωτότυπου συστήματος, εάν φυσικά μπορεί να υπάρξει σε αυτό αρχική κατάσταση. Το μαρκάρισμα δύναται να μεταβάλλεται κάθε χρονική στιγμή. Εάν βέβαια κάποια χρονική στιγμή καμία μετάβαση δεν είναι ενεργή τότε το μαρκάρισμα δεν θα μεταβληθεί. Εάν ακόμη το μοντέλο λειτουργήσει για  $k$  χρονικές στιγμές θα έχουμε  $k$  μαρκάρια :  $m_0, m_1, \dots, m_k$ . Αυτό που στην ουσία μας ενδιαφέρει είναι η μελέτη της μεταβολής του μαρκάριατος.

Κλείνοντας αυτή την εισαγωγή στα Δίκτυα Πέτρι δίδεται ο μαθηματικός ορισμός της απλής μορφής τους :

### Ορισμός

Ένα Δίκτυο Πέτρι είναι μια 5-άδα  $N = (P, T, F, W, m_0)$  όπου  $P$  και  $T$  είναι πεπερασμένα σύνολα και

1.  $P$  είναι το σύνολο των θέσεων.
2.  $T$  είναι το σύνολο των μεταβάσεων.
3. Η σχέση  $F \subseteq (P \times T) \cup (T \times P)$ , είναι η «σχέση ροής» του  $N$ , συμπεριλαμβανομένων των ακμών, δηλαδή  $(p, t)$  ή  $(t, p)$  όπου  $p$  είναι μια θέση και  $t$  μια μετάβαση.
4. Μια απεικόνιση  $W : F \rightarrow \mathbb{N}$ , η οποία αντιστοιχεί κάθε ακμή  $(\chi, \psi)$  σε έναν ακέραιο αριθμό, το βάρος της ακμής  $W(\chi, \psi)$ .
5. Ένα αρχικό μαρκάρισμα  $m_0 : P \rightarrow \mathbb{N}$ , το οποίο αντιστοιχεί κάθε θέση  $p$  με ένα αρχικό αριθμό σημείων (μάρκια),  $m_0(p)$ .

### 3.3 Δομική Ανάλυση των Δικτύων Πέτρι [12, pp. 37-55]

Έχοντας κατασκευάσει ένα μοντέλο σε δίκτυα Πέτρι μας ενδιαφέρει να το αναλύσουμε με σκοπό πρώτα να κατανοήσουμε καλύτερα τη λειτουργία του πραγματικού συστήματος και έπειτα να ελέγξουμε κάποιες ιδιότητες που ενδεχομένως να έχουν τα συστατικά του. Ακολουθούν κάποια παραδείγματα ερωτήσεων που θα θέλαμε να ερευνήσουμε σε ένα μοντέλο :

- Η συγκέντρωση των μάρκων στη θέση  $n$  παραμένει σταθερή;
- Η συγκέντρωση των μάρκων στη θέση  $n$  δεν ξεπερνά ποτέ το  $k$ ;
- Ξεκινώντας από το μαρκάρισμα  $m_0$ , μπορούμε μετά από κάποια βήματα να φθάσουμε πάλι σ' αυτό;
- Η μετάβαση  $n$  ενεργοποιείται από κάθε αρχικό μαρκάρισμα;

Μπορούμε να προχωρήσουμε σε τέτοιου είδους αναλύσεις χρησιμοποιώντας γραμμική άλγεβρα. Για τον σκοπό αυτό αναπαριστούμε το Δίκτυο Πέτρι

προς μελέτη υπό τη μορφή ενός πίνακα  $N$ . Έχοντας αυτό τον πίνακα υπολογίζουμε τις λύσεις των εξισώσεων  $N \cdot x = 0$  και  $N^T \cdot x = 0$  εκ των οποίων εξάγονται χρήσιμα στοιχεία.

Για την κατασκευή του πίνακα  $N$  θα πρέπει να υποθέσουμε μια διάταξη των στοιχείων του συνόλου των θέσεων και του συνόλου των μεταβάσεων. Η διάταξη μπορεί να εξαχθεί έμμεσα από την ονομασία των στοιχείων ή να οριστεί άμεσα. Έστω το σύνολο των θέσεων  $P = \{p_1, p_2, \dots, p_k\}$ . Κάθε μαρκιαρίσμα  $M : P \rightarrow \mathbb{N}$  μπορεί να αναπαρασταθεί σαν ένα διάνυσμα :

$$M = \begin{pmatrix} a_1 \\ \dots \\ a_k \end{pmatrix}$$

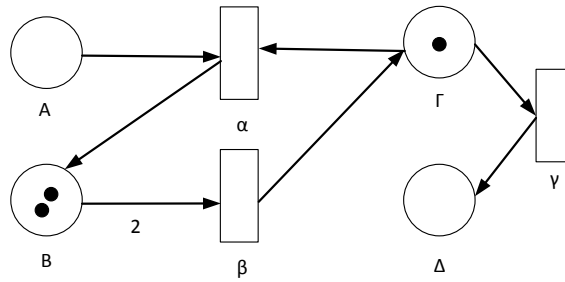
όπου το  $a_i$  συμβολίζει τον αριθμό των μαρκων πάνω στη θέση  $p_i$ . Κατά αντίστοιχο τρόπο ορίζουμε για κάθε μετάβαση ένα διάνυσμα  $T$  :

$$T = \begin{pmatrix} t(p_1) \\ \dots \\ t(p_k) \end{pmatrix}$$

Το  $t(p_i)$  είναι η μεταβολή που θα προκαλέσει μια μετάβαση και ορίζεται ως εξής: Έστω  $W(t,p)$  το βάρος της ακμής που ξεκινά από τη θέση  $p$  και καταλήγει στη μετάβαση  $t$  και  $W(p,t)$  το βάρος της ακμής που ξεκινά από το  $t$  και καταλήγει στο  $p$ . Εάν έχουμε περισσότερες ακμές τότε αθροίζουμε το συνολικό βάρος. Έτσι έχουμε ότι :

$$t(p) := W(t,p) - W(p,t)$$

Παίρνουμε για παράδειγμα το Δίκτυο Πέτρι της εικόνας 3.3.6. Κατασκευάζουμε τον πίνακα  $N$  από τα διανύσματα των μεταβάσεων του μοντέλου. Ο πίνακας μαρκιαρίσματος μπορεί να είναι ξεχωριστός ή συνέχεια του πίνακα  $N$ .



**Εικόνα 3.3.6**

Ο πίνακας  $N$  παρακάτω δίνει μια εναλλακτική μορφή παρουσίασης του Δικτύου Πέτρι. Οι κενές θέσεις ισοδυναμούν με μηδενική αλλαγή. Στη συνέχεια θα δούμε κάποιες ιδιότητες που χρησιμοποιούν αυτό τον πίνακα για να πραγματοποιήσουν δομική ανάλυση.

| $N$      | $\alpha$ | $\beta$ | $\gamma$ | $m_0$ |
|----------|----------|---------|----------|-------|
| <b>A</b> | -1       |         |          |       |
| <b>B</b> | 1        | -2      |          | 2     |
| <b>Γ</b> | -1       | 1       | -1       | 1     |
| <b>Δ</b> |          |         | 1        |       |

**Πίνακας 3.3.1 :** Πίνακας  $N$  για το δίκτυο της εικόνας 3.3.6

### 3.3.1 Αναλλοίωτες Θέσεις και Μεταβάσεις

Η ιδιότητα των αναλλοίωτων θέσεων αποσκοπεί στον εντοπισμό ενός υποσυνόλου των θέσεων από ο συνολικός αριθμός των μάρκων είναι σταθερός. Μαζί με την τις αναλλοίωτες μεταβάσεις, εισηγήθηκαν για πρώτη φορά το 1973 από τον K. Lautenbach.<sup>1</sup> Στα βιολογικά συστήματα η ιδιότητα χρησιμεύει στην αναγνώριση αντιδράσεων που απαρτίζουν ένα μονοπάτι. Μας ενδιαφέρουν οι λύσεις του ομογενούς γραμμικού συστήματος

$$N^T \cdot x = 0$$

όπου  $N^T$  ο ανάστροφος πίνακας του  $N$  που περιγράφηκε προηγουμένως.

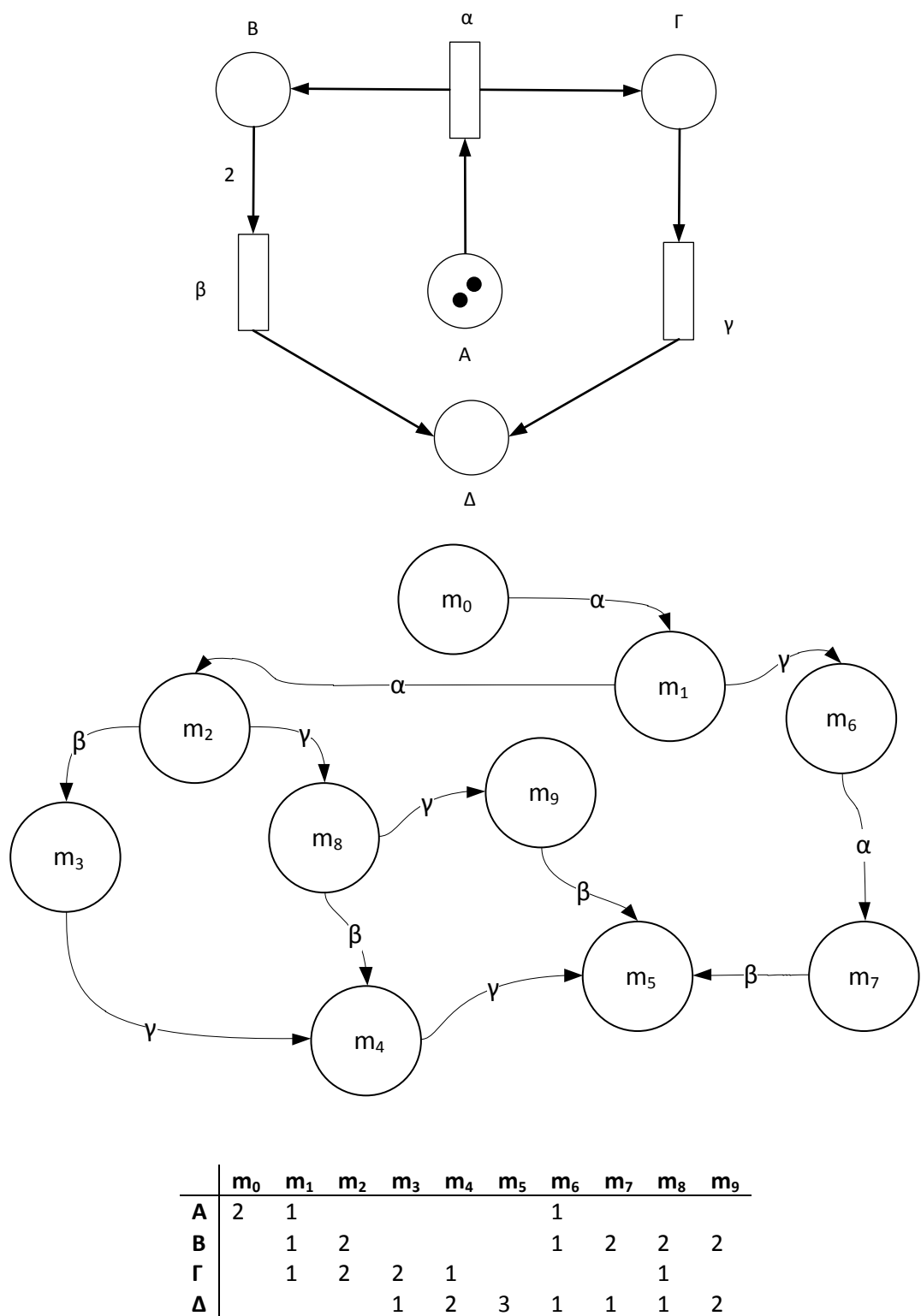
<sup>1</sup> K. Lautenbach, «Exakte Bedingungen der Lebendigkeit für eine Klasse von Petrinetzen,» Berichte der GMD 82, Bonn, 1979. ( Διαθέσιμο μόνο στη γερμανική γλώσσα )

Από την άλλη οι αναλλοίωτες μεταβάσεις για ένα δίκτυο Πέτρι με κάποιο αρχικό μαρκάρισμα  $m_0$  είναι το σύνολο των μεταβάσεων που πρέπει να πυροδοτήσουν προκειμένου το δίκτυο να επιστρέψει στο μαρκάρισμα  $m_0$ .

### 3.3.2 Προσβασιμότητα

Η ιδιότητα της προσβασιμότητας (reachability) αναφέρεται στον έλεγχο που κάνουμε για να ελέγξουμε, δοσμένου ενός Δικτύου Πέτρι με αρχικό μαρκάρισμα  $m_0$  και ένα άλλο μαρκάρισμα  $m'$ , κατά πόσο υπάρχει δυνατότητα μετά από  $t \geq 0$  βήματα το δίκτυο να φθάσει στο μαρκάρισμα  $m'$ .

Για ένα Δίκτυο Πέτρι,  $N = (S, T, W, M_0)$ , θεωρούμε το σύνολο όλων των προσβάσιμων μαρκαρισμάτων ως  $R(N) = \{M' \mid M_0 \xrightarrow{(S, T, W)^*} M'\}$ . Ο γράφος προσβασιμότητας ή χώρος καταστάσεων (reachability graph or state space) είναι ένας γράφος που περιλαμβάνει όλα τα δυνατά μαρκαρίσματα ξεκινώντας από το αρχικό. Η κατασκευή του γράφου προσβασιμότητας είναι απλή. Αρχικά ο γράφος έχει ένα κόμβο που αντιστοιχεί στο αρχικό μαρκάρισμα. Στη συνέχεια, για κάθε ενεργή μετάβαση, από το αρχικό μαρκάρισμα προσθέτουμε το μαρκάρισμα που φθάνουμε εάν η μετάβαση πυροδοτηθεί. Συνεχίζουμε αυτή τη διαδικασία μέχρι να καλυφθούν όλα τα δυνατά μαρκαρίσματα. Στην εικόνα 3.3.2.1 βλέπουμε ένα παράδειγμα ενός Δικτύου Πέτρι με τον αντίστοιχο γράφο προσβασιμότητας.



**Εικόνα 3.3.2.1** – Κατασκευή του γράφου προσβασιμότητας από ένα Δίκτυο Πέτρι

Σημειώνουμε ότι ο γράφος προσβασιμότητας μπορεί να έχει άπειρους κόμβους εάν το Δίκτυο Πέτρι δεν είναι οριοθετημένο (bounded), έννοια την οποία εξετάζουμε στη συνέχεια. Σε αυτή την περίπτωση δεν είναι πρακτική η κατασκευή του και δεν μπορούμε να τον χρησιμοποιήσουμε για περαιτέρω έλεγχο. Παρά ταύτα, σε αυτές τις περιπτώσεις μπορεί να εφαρμοσθεί μια παρόμοια τεχνική, ο γράφος επικάλυψης (coverability graph).

### 3.3.3 Ζωτικότητα

Η ιδιότητα της ζωτικότητας (liveness) αναφέρεται στις μεταβάσεις ενός Δικτύου Πέτρι. Μας ενδιαφέρει, ξεκινώντας από το αρχικό μαρκάρισμα  $m_0$ , η δυνατότητα ενεργοποίησης για οποιονδήποτε προσβάσιμο μαρκάρισμα. Η λειτουργικότητα του μοντέλου και ανενεργές εργασίες μπορούν να εντοπιστούν διαμέσου του ελέγχου ζωτικότητας. Στη βιολογία, μπορούμε να εντοπίσουμε βιοχημικές αντιδράσεις που απενεργοποιούνται εάν αφαιρέσουμε ή μεταλλάξουμε μια πρωτεΐνη.

Όπως έχει λεχθεί, μια μετάβαση είναι ενεργή όταν όλες οι θέσεις που εισέρχονται σε αυτή έχουν τον ελάχιστο αριθμό από μάρκες που απαιτούνται από τα βάρη των ακμών τους. Σε αντίθεση περίπτωση η μετάβαση είναι ανενεργή. Μια μετάβαση καλείται νεκρή εάν δεν ενεργοποιείται ποτέ για οποιονδήποτε προσβάσιμο μαρκάρισμα από το αρχικό. Σε αντίθετη περίπτωση καλείται ζωντανή. Αναφέρουμε επίσης ότι διακρίνονται τέσσερις βαθμοί ζωτικότητας μεταξύ νεκρής και ζωντανής μετάβασης.

### 3.3.4 Οριοθέτηση

Ένα Δίκτυο Πέτρι καλείται οριοθετημένο (bounded) όταν ο μέγιστος αριθμός των μάρκων είναι πεπερασμένος για όλα τα προσβάσιμα μαρκάρια.

από το αρχικό. Εάν ο αριθμός των μάρκων δεν ξεπερνά το  $k$  τότε το μοντέλο λέγεται  $k$ -οριοθετημένο. Στη βιολογία για παράδειγμα, με αυτή την ιδιότητα, μπορούμε να εντοπίσουμε υψηλές συγκεντρώσεις τοξικών ουσιών.

Ένα μοντέλο με οριοθέτηση  $k = 1$  ονομάζεται και ασφαλές (safe Petri Net). Επίσης καλείται δομικά οριοθετημένο εάν είναι οριοθετημένο για όλα τα πιθανά αρχικά μαρκαρίσματα. Όπως έχει προαναφερθεί, για να έχει ένα Δίκτυο Πέτρι πεπερασμένο γράφο προσβασιμότητας πρέπει το μοντέλο να είναι οριοθετημένο. Εάν η οριοθέτηση είναι αναγκαία, υπάρχουν τεχνικές οριοθέτησης όπως είναι το να καθορίσουμε ένα μέγιστο αριθμό μάρκων για κάθε θέση του μοντέλου. Επίσης, μέσω μιας τεχνικής που δεν εξετάζεται εδώ, μπορούμε να προσθέσουμε επιπλέον θέσεις που αναγκάζουν την οριοθέτηση του μοντέλου.

### 3.3.5 Παγίδα

Μια παγίδα (trap) ενός Δικτύου Πέτρι είναι ένα υποσύνολο  $Q$  του συνόλου των θέσεων με το εξής χαρακτηριστικό : Κάθε μετάβαση που αφαιρεί μία μάρκα από κάποια θέση του  $Q$  προσθέτει μία μάρκα στο  $Q$ . Η αιτία που μια τέτοια ιδιότητα θα μπορούσε να είναι χρήσιμη είναι η εγγύηση παρουσίας τουλάχιστον μίας μάρκας. Εάν δηλαδή γνωρίζουμε ότι το αρχικό μαρκάρισμα προνοεί μία μάρκα σε μια παγίδα τότε για κάθε προσβάσιμο μαρκάρισμα η παγίδα θα έχει τουλάχιστον μία μάρκα. Δηλαδή τρόπον τινά η μάρκα είναι παγιδευένη και δεν μπορεί να διαφύγει.

### 3.3.6 Σιφόνι

Μια παρόμοια ιδιότητα είναι το σιφόνι (siphon - δοχείο με αέριο υπό πίεση). Είναι ένα υποσύνολο  $Q$  του συνόλου των θέσεων ενός Δικτύου Πέτρι όπου κάθε μετάβαση που συνεισφέρει μία μάρκα στο  $Q$  επίσης αφαιρεί μία μάρκα από

αυτό. Χρησιμοποιείται για να ελεγχθεί η διατήρηση της κενότητας ενός υποσυνόλου, αφού εάν ένα σιρόνι αδειάσει από όλες τις μάριες θα παραμείνει για πάντα άδειο.

### 3.4 Επεκτάσεις Δικτύων Πέτρι

Ο βασικός ορισμός των Δικτύων Πέτρι, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα, είναι αρκετά περιοριστικός στην ανάπτυξη μεγάλων και περίπλοκων μοντέλων. Έχουν προταθεί αρκετές επεκτάσεις στη βιβλιογραφία οι οποίες εισαγάγουν μεγαλύτερη ευελιξία για μια απόδοση της περιγραφής του μοντέλου σε υψηλότερο επίπεδο. Κατ'ακρίβεια η εκφραστικότητα των επεκτάσεων δεν είναι μεγαλύτερη από τα βασικά Δίκτυα Πέτρι μιας και οι περισσότερες επεκτάσεις μπορούν να μετατραπούν στο βασικό ορισμό. Το κέρδος αφορά στην ευκολότερη και περισσότερη κατανοητή περιγραφή των μοντέλων καθώς και στη μείωση του μεγέθους των. Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται οι δημοφιλέστερες επεκτάσεις που χρησιμοποιούνται σήμερα από την επιστημονική κοινότητα.

#### 3.4.1 Συναρτησιακά Δίκτυα Πέτρι

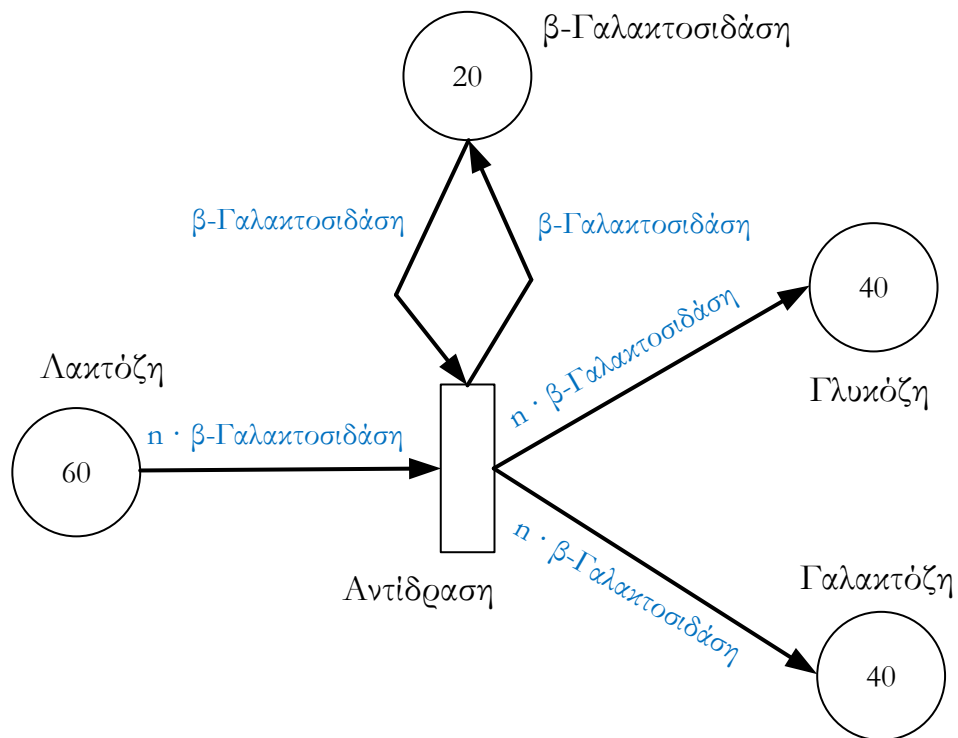
Η έλλειψη της δυναμικής συμπεριφοράς ενός απλού δικτύου Πέτρι καθιστούσε αποτρεπτική την εφαρμογή τους σε ορισμένες βιολογικές διεργασίες όπως είναι τα δίκτυα μεταβολιτών όπου η συγκέντρωση των μεταβολικών ουσιών επηρεάζει την βιοχημική αντίδραση. Ο Valk R. το 1978 είχε προτείνει το αυτομεταβαλλόμενα δίκτυα, βασισμένα στα Δίκτυα Πέτρι [13]. Οι Hofestädt και Thelen, είκοσι χρόνια αργότερα, αξιοποίησαν την εργασία του Valk στη μοντελοποίηση μεταβολικών αντιδράσεων και ονόμασαν την καινούργια επέκταση Συναρτησιακά Δίκτυα Πέτρι (Functional Petri Nets) [14]. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτής της επέκτασης, είναι η δυνατότητα που προσφέρει στην ανάθεση συναρτήσεων ως βάρος των ακμών. Κάθε αναγνωριστικό μιας θέσης μπορεί να

χρησιμοποιηθεί ως παράμετρος στη συνάρτηση που τίθεται ως βάρος σε μια ακμή. Σε κάθε βήμα, το βάρος των ακμών επαναυπολογίζεται, ανάλογα με την κατάσταση του δικτύου, με αποτέλεσμα την επίτευξη δυναμικής συμπεριφοράς.

### Μεταβολισμός

Όλες οι χημικές διαδικασίες που εξελίσσονται σε ένα ζωντανό οργανισμό. Είναι μια αμφίδρομη διαδικασία στην οποία οι οργανισμοί διασπούν και συνθέτουν αδιάκοπα χημικές ουσίες παράγοντας έτσι την απαραίτητη ενέργεια που χρειάζονται.

Ένα παράδειγμα παρουσιάζεται στην εικόνα 3.4.1.1 από το [14]. Κατά την αντίδραση βιοκατάλυσης της λακτόζης θα παραχθεί μια ποσότητα γλυκόζης και γαλακτόζης. Η αντίδραση θα πραγματοποιηθεί μόνο εάν υπάρχει το ένζυμο β-Γαλακτοσιδάση και ανάλογα με την συγκέντρωση του ενζύμου θα εξαρτηθεί η ποσότητα των προϊόντων καθώς και το ποσό μεταβολής της γλυκόζης. Συγκεκριμένα, και όπως φαίνεται στην εικόνα, το ποσό της γλυκόζης που θα μεταβληθεί είναι μια γραμμική εξάρτηση της ποσότητας του ενζύμου β-Γαλακτοσιδάσης. Έτσι η ακμή που συνδέει τη θέση της Γλυκόζης με τη μετάβαση έχει βάρος  $n \cdot \beta\text{-Γαλακτοσιδάση}$ . Το ίδιο βάρος έχουν και οι ακμές που καταλήγουν στα προϊόντα. Κατά την αντίδραση χρησιμοποιείται ολόκληρη η ποσότητα της β-Γαλακτοσιδάσης η οποία όμως δεν μεταβάλλεται. Έστω το αρχικό μαρξάρισμα  $m_0 = \{ \{ \text{Λακτόζη}, 100 \}, \{ 20, \beta\text{-Γαλακτοσιδάση} \}, \{ 0, \text{Γλυκόζη} \}, \{ 0, \text{Γαλακτόζη} \} \}$  με γραμμικό παράγοντα  $n = 2$ . Το αποτέλεσμα της πυροδότησης της αντίδρασης φαίνεται στην εικόνα, όπου αμφότερα τα προϊόντα θα αποκτήσουν 40 μόρια.



**Εικόνα 3.4.1.1 :** Ένα Συναρτησιακό Δίκτυο Πέτρι για τη διαδικασία της βιοκατάλυσης της Λακτόζης.

Ο τυπικός ορισμός ενός Συναρτησιακού Δικτύου Πέτρι έχει ως εξής :

#### Ορισμός

Ένα Συναρτησιακό Δίκτυο Πέτρι είναι μια 6-άδα  $N = (P, T, F, W, V, m_0)$  όπου:

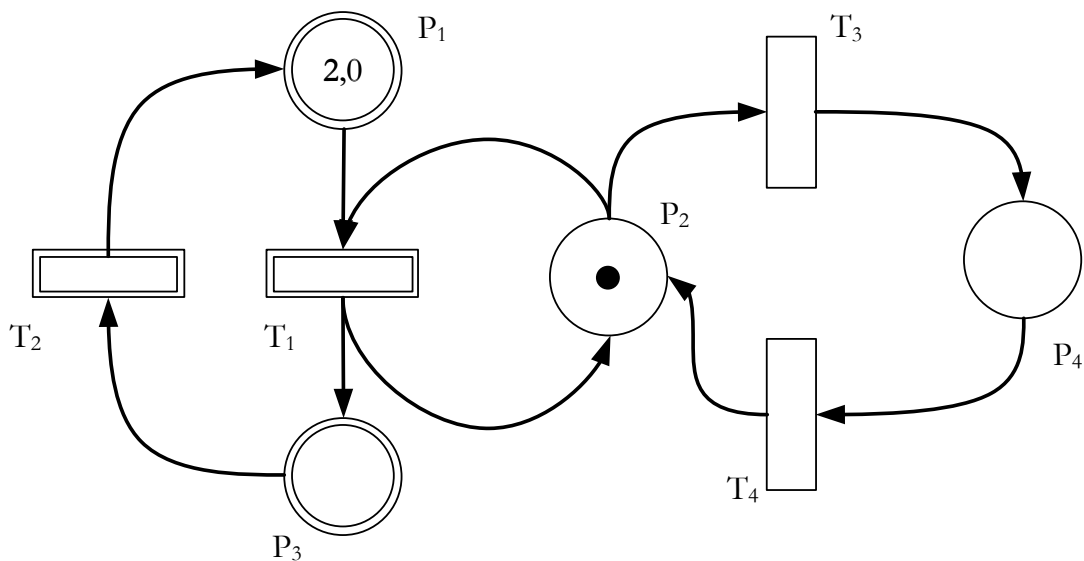
1.  $(P, T, F, W, m_0)$  είναι ένα Δίκτυο Πέτρι όπως περιγράφηκε στον απλό ορισμό.
2.  $V = \{ g_a(m_1, \dots, m_u), a \in F \mid g : p_1 \times \dots \times p_u \rightarrow \mathbb{N} \}$ , ένα σύνολο συναρτήσεων όπου η κάθε μια χρησιμοποιεί ως παραμέτρους αναγνωριστικά των θέσεων  $(p_1, p_2, \dots, p_u)$  και το μαρκάρισμα  $(m_1, \dots, m_u)$  του δικτύου.

### 3.4.2 Υβριδικά Δίκτυα Πέτρι

Οι προσεγγίσεις μοντελοποίησης με Δίκτυα Πέτρι συνήθως χρησιμοποιούν διακριτές ποσότητες δεδομένων ( συγκεντρώσεις μορίων ) για να δηλώσουν την παρουσία βιολογικών στοιχείων. Ωστόσο, ένας διαισθητικός τρόπος ορισμού

βιολογικών μοντέλων είναι ο καθορισμός συνεχών ποσοτήτων αντί διακριτών. Τα Υβριδικά Δίκτυα Πέτρι (Hybrid Petri Nets) [15] εφαρμόζουν μια υβριδική προσέγγιση όπου διακριτές και συνεχείς ποσότητες στοιχείων συνυπάρχουν στο ίδιο μοντέλο.

Τα νέα δομικά στοιχεία είναι οι συνεχείς θέσεις και οι συνεχείς μεταβάσεις όπου ο αριθμός των σημείων είναι ένας θετικός πραγματικός αριθμός, το σημάδι (mark). Επίσης μια μεταβλητή, η ταχύτητα, ανατίθεται στις νέες συνεχείς μεταβάσεις. Για το συμβολισμό των δυο νέων δομικών στοιχείων χρησιμοποιείται διπλή γραμμή για το περίγραμμα των συμβόλων.



**Εικόνα 3.4.2 :** Ένα απλό υβριδικό δίκτυο Πέτρι. Οι συνεχείς θέσεις και μεταβάσεις συμβολίζονται με διπλή εξωτερική γραμμή.

Στην εικόνα 3.4.2 φαίνεται ένα απλό υβριδικό δίκτυο Πέτρι από το [15] στο οποίο συνυπάρχουν διακριτές και συνεχείς ποσότητες. Οι  $P_1$  και  $P_3$  είναι συνεχείς θέσεις, οι  $T_1$  και  $T_2$  είναι συνεχείς μεταβάσεις, οι  $P_2$  και  $P_4$  είναι διακριτές θέσεις και  $T_3$  και  $T_4$  είναι διακριτές μεταβάσεις. Οι μεταβάσεις  $T_1$  και  $T_3$  είναι ενεργές. Έστω ότι πυροδοτεί η  $T_1$  με ταχύτητα 0.1. Τότε το νέο μαρκάρισμα του δικτύου θα είναι (1.9 , 1, 0.1, 0). Αυτό διότι η ποσότητα 0.1 αφαιρέθηκε από τις

$P_1$  και  $P_2$  που είναι οι θέσεις εισόδου της  $T_1$  και προστέθηκε στις θέσεις  $P_2$  και  $P_3$  που είναι οι θέσεις εξόδου.

Ο ορισμός ενός υβριδικού δικτύου Πέτρι έχει ως εξής :

### Ορισμός

Ένα **Υβριδικό Δίκτυο Πέτρι** είναι μια 6-άδα  $N = (P, T, F, W, h, m_0)$  όπου :

1.  $(P, T, F, W, m_0)$  είναι ένα Δίκτυο Πέτρι όπως περιγράφηκε στο βασικό ορισμό, όπου το αρχικό μαρkiάρισμα  $m_0$  αποτελεί ένα συνδυασμό ακεραιών και πραγματικών αριθμών, για τις ποσότητες των διακριτών και συνεχών θέσεων αντιστοίχως.
2.  $h = P \cup T \rightarrow \{D, C\}$  , καλείται μια υβριδική συνάρτηση και προσδιορίζει για κάθε θέση και μετάβαση, εάν είναι διακριτά ( $h(p_i) = D$  και  $h(t_j) = D$ ) ή συνεχής ( $h(p_k) = C$  και  $h(t_l) = C$ ).

Μια καθυστέρηση  $d_i$  ανατίθεται σε όλες τις διακριτές μεταβάσεις και μια ταχύτητα  $v_i$  ανατίθεται σε όλες τις συνεχείς μεταβάσεις.

Για να είναι ικανά τα Υβριδικά Δίκτυα Πέτρι να ανταποκριθούν με περισσότερη ακρίβεια στις βιολογικές διεργασίες έχουν εισαχθεί στο μοντέλο περισσότερες ιδιότητες. Η νέα μορφή του μοντέλου λέγεται Υβριδικά Συναρτησιακά Δίκτυα Πέτρι. Όπως φαίνεται και από την ονομασία, οι νέες ιδιότητες προέρχονται από τα Συναρτησιακά Δίκτυα Πέτρι. Επιπλέον, δυο νέοι τύποι ακμών, διαφορετικοί από αυτούς που χρησιμοποιούν οι υπόλοιπες επεκτάσεις, περιλαμβάνονται στο μοντέλο.

Η πρώτη λέγεται ακμή αναστολής (inhibition arc) και αποσκοπεί στη μοντελοποίηση της ανασταλτικής λειτουργίας των μορίων σε ορισμένες αντιδράσεις. Μια ανασταλτική ακμή με βάρος  $r$  ενεργοποιεί την πυροδότηση μιας μετάβασης μόνο αν το περιεχόμενο της εισερχόμενης θέσης είναι μικρότερο ή ίσο του  $r$ .

Το δεύτερο νέο είδος ακμής λέγεται ακμή ελέγχου ( test arc ) και ελέγχει την παρουσία περιεχομένου στην εισερχόμενη θέση ενώ η σχετιζόμενη με αυτή μετάβαση πυροδοτεί χωρίς να καταναλώνει καθόλου μάρκες.

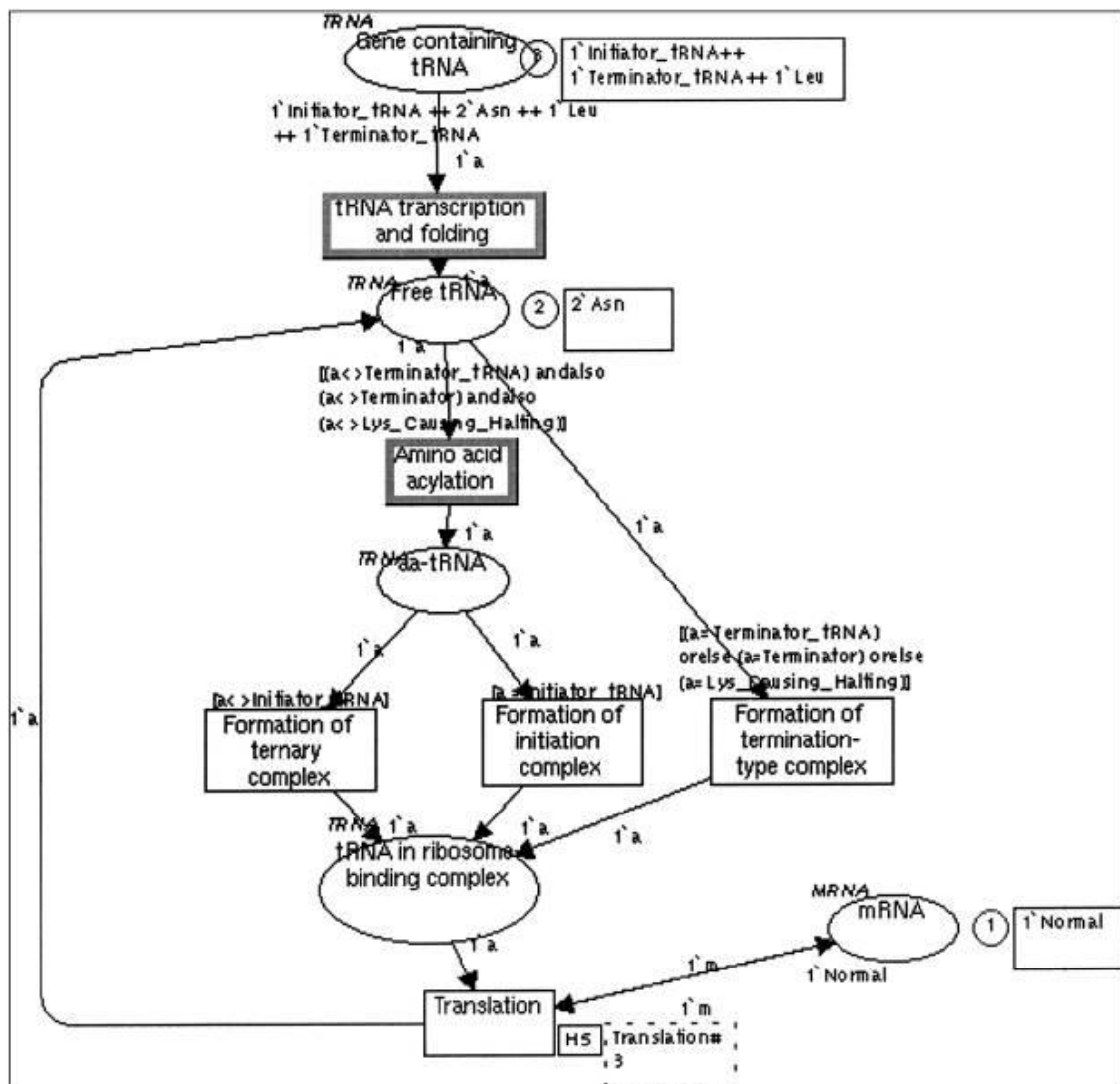
### 3.4.3 Χρωματισμένα Δίκτυα Πέτρι

Μια ενδιαφέρουσα επέκταση των Δικτύων Πέτρι είναι τα Χρωματισμένα Δίκτυα Πέτρι (Colored Petri Nets) [16]. Συνδυάζουν τις δυνατότητες ενός Δικτύου Πέτρι με τις δυνατότητες μιας γλώσσας προγραμματισμού υψηλού επιπέδου. Η γλώσσα προγραμματισμού CPN ML, η οποία βασίζεται στη συναρτησιακή γλώσσα προγραμματισμού standard ML παρέχει το πρωτόκολλο για τον ορισμό τύπων δεδομένων, για χειρισμό των δεδομένων και τη δημιουργία συμπαγών και παραμετρικών μοντέλων [16]. Τα Χρωματισμένα Δίκτυα Πέτρι δεν έχουν κατασκευαστεί για τη μοντελοποίηση μιας συγκεκριμένης κλάσης συστημάτων αλλά κρίνονται κατάλληλα για συστήματα που χαρακτηρίζονται από ταυτοχρονία και επικοινωνία.

Το χρώμα είναι μια επιπλέον παράμετρος στο μοντέλο. Οι μάρκες δεν συμβολίζουν όλες το ίδιο αντικείμενο αλλά δύνανται να διαφοροποιηθούν με βάση το χρώμα που τους αποδίδεται. Η αλλαγή και μόνο του χρώματος των σημείων επιτρέπει την διερεύνηση διαφορετικών δυναμικών συμπεριφορών του ιδίου μοντέλου.

Ακολουθεί ένα παράδειγμα παρμένο από τη διαδικασία σύνθεσης πρωτεϊνών στο κύτταρο. Μέρος της φάσης αυτής, που ονομάζεται μετάφραση ,το μεταφορικό RNA (tRNA) μαζί με το mRNA και ριβοσωμάτια συνεργάζονται για την παραγωγή πρωτεϊνών. Στην εικόνα 3.4.3.1 παρουσιάζεται ένα Χρωματισμένο Δίκτυο Πέτρι κατασκευασμένο στο Design/CPN (ενότητα 3.7.1) ,που μοντελοποιεί αυτή τη διαδικασία και είναι παρμένο από το [17]. Δίπλα από τις θέσεις βρίσκονται κύκλοι με ένα αριθμό στο εσωτερικό τους και δηλώνουν το τρέχον μαρκαρίσμα. Το είδος των μάρκων για κάθε θέση παρουσιάζεται σε ένα τετρά-

γωνο δίπλα από τους κύκλους. Δίπλα από κάθε θέση, μια επιγραφή καθορίζει το σύνολο των χρωμάτων ( τύπο δεδομένων ) τον οποίο δικαιούνται να έχουν οι μάρκες σε αυτή τη θέση. Το αρχικό μαρκάρισμα φαίνεται επίσης στο μοντέλο. Συγκεκριμένα οι θέσεις “Gene containing tRNA” και “mRNA” έχουν αρχικό μαρκάρισμα το οποίο επιγράφεται κάτω από το σύμβολό τους. Οι ακμές έχουν βάρη 1’α και 1’m αναπαριστώντας τις μάρκες που ανήκουν στα σύνολα χρωμάτων tRNA και mRNA αντίστοιχα. Οι εκφράσεις πάνω από τις μεταβάσεις ονομάζονται συνθήκες-φρουροί και πρέπει να αληθεύουν για την ενεργοποίηση των μεταβάσεων. Οι ενεργές μεταβάσεις φαίνονται με πιο έντονο πλαίσιο. Κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης, μία από τις ενεργές μεταβάσεις επιλέγεται τυχαία για να πυροδοτήσει παράγοντας το επόμενο μαρκάρισμα για το μοντέλο. Τέλος, το μοντέλο δείχνει και την δυνατότητα ορισμού ιεραρχίας. Η μετάβαση “translation” είναι ιεραρχική και αναπαριστά την ύπαρξη ενός υπομοντέλου, δηλαδή μιας άλλης βιολογικής διεργασίας.



**Εικόνα 3.4.3.1:** Μοντέλο Χρωματισμένων Δικτύων Πέτρι που περιγράφει τη μεταγραφή του tRNA και την ενσωμάτωση στις πρωτεΐνες.

Η επέκταση έχει προταθεί από την ομάδα CPN στο πανεπιστήμιο Aarhus στη Δανία από το 1979. Η πρώτη εκδοχή ήταν μέρος μιας διδακτορικής διατριβής.

Ο ορισμός τους έχει ως εξής :

### Ορισμός

Ένα **Χρωματισμένο Δίκτυο Πέτρι** είναι μια 6-άδα  $N = (P, T, F, W, C, m_0)$  όπου :

1.  $(P, T, F, W, m_0)$  είναι ένα Δίκτυο Πέτρι όπως περιγράφηκε στο βασικό ορισμό όπου επιπλέον οι μάρκες αναγνωρίζονται από ένα χρώμα.
2.  $C = \{C_1, C_2, \dots\}$ , ένα σύνολο χρωμάτων.

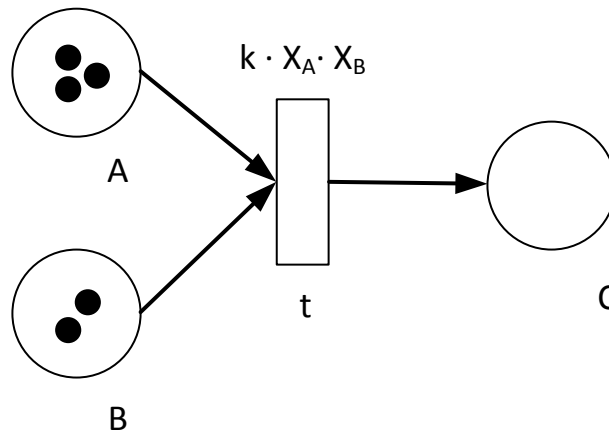
Αρχικά χρησιμοποιούνταν μόνο μερικά χρώματα ενώ αργότερα η θεωρία της επέκτασης γενικεύτηκε σε σύνθετους τύπους δεδομένων. Τα σύνολα χρωμάτων μετατράπηκαν σε τύπους και τα χρώματα σε τιμές. Η σχέση των Χρωματισμένων Δικτύων Πέτρι με τα βασικά Δίκτυα Πέτρι είναι ανάλογη της σχέσης των γλωσσών υψηλού επιπέδου με τις γλώσσες μηχανής. Έτσι ενώ έχουν τις ίδιες υπολογιστικές δυνατότητες τα Χρωματισμένα Δίκτυα Πέτρι παρέχουν στον ερευνητή τη δυνατότητα να μοντελοποιήσει εύκολα πιο σύνθετα συστήματα.

#### 3.4.4 Στοχαστικά Δίκτυα Πέτρι

Οι χημικές αντιδράσεις, που γίνονται μέσα σε ένα ζωντανό κύτταρο, γίνονται συνήθως κατά ένα τυχαίο τρόπο και ο ρυθμός που αυτές συμβαίνουν εξαρτάται από ένα αριθμό παραγόντων (μοριακή συγκέντρωση ουσιών, θερμοκρασία, pH και άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες). Ο βασικός ορισμός των Δικτύων Πέτρι δεν μας επιτρέπει να μοντελοποιήσουμε με ρεαλιστικό τρόπο βιολογικά συστήματα σε μεγαλύτερη λεπτομέρεια διότι λειτουργεί αυστηρώς αιτιοκρατικά (οι μεταβάσεις πυροδοτούνται άμεσα εφόσον δημιουργηθούν οι προϋποθέσεις ενεργοποίησης). Τα Στοχαστικά Δίκτυα Πέτρι (Stochastic Petri Nets) [12] επιχειρούν να καλύψουν το κενό εισάγοντας την έννοια της στοχαστικής αναϊοκρατίας. Αυτή η παραλλαγή επιτρέπει την ποσοτική ανάλυση ενός μοντέλου με την περιγραφή του τρόπου της διεξαγωγής των αντιδράσεων.

Η αναπαραστατική λειτουργία του μοντέλου εκφράζεται στον τρόπο λειτουργίας των μεταβάσεων. Οι μεταβάσεις δεν πυροδοτούνται άμεσα. Ο χρόνος που μπορεί να πυροδοτήσει μια ενεργοποιημένη μετάβαση είναι μια συνεχής τυχαία μεταβλητή η οποία ακολουθεί μια αρνητική εκθετική κατανομή. Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να αναπαραστήσουμε το ρυθμό αντίδρασης, δηλαδή τη συχνότητα με την οποία γίνονται οι αντιδράσεις μέσα στο κύτταρο και η οποία αλλάζει δυναμικά.

Η θεωρία των Στοχαστικών Δικτύων Πέτρι (ΣΔΠ) βασίζεται στην εργασία του Gillespie [18] ο οποίος χαρακτήρισε με ακρίβεια τη στοχαστική συμπεριφορά των χημικών συστημάτων ορίζοντας την πιθανότητα διεξαγωγής μιας αντίδρασης. Ως ένα απλό παράδειγμα λειτουργίας θεωρούμε την απλή αντίδραση της εικόνα 3.4.1.1 [12, p. 128]. Η αρχική κατάσταση του μοντέλου είναι  $X_A = 3$ ,  $X_B = 2$  και  $X_C = 0$ . Η πιθανότητα να πυροδοτηθεί η μετάβαση  $t$  σε κάθε επόμενο βήμα είναι  $k \cdot X_A \cdot X_B$  για κάποιο σταθερό ρυθμό  $k$ . Ο δημιουργός του μοντέλου ορίζει την κατάλληλη σταθερά  $k$  έτσι ώστε να πετύχει τη ρεαλιστική προσομοίωση του βιολογικού συστήματος. Μια λεπτομερής επεξήγηση της στοχαστικής υπολογιστικής θεωρίας βρίσκεται στα [18, 12].



**Εικόνα 3.4.4.1** Μια στοχαστική αντίδραση

## Ορισμός

Ένα **Στοχαστικό Δίκτυο Πέτρι** είναι μια 7-άδα  $N = (P, T, F, W, S, \lambda, m_0)$  όπου

1.  $(P, T, F, W, m_0)$  είναι ένα βασικό Δίκτυο Πέτρι.
2.  $S = \{S_t, t \in T \mid S_t : [0, \infty) \rightarrow [0, 1]\}$ , ένα σύνολο από συναρτήσεις πυκνότητας πιθανότητας για τις καθυστερήσεις πυροδότησης του δικτύου. Ο μέσος όρος τους είναι 1 και είναι ανεξάρτητες του μαρκαρίσματος.
3.  $\lambda = \{\lambda_t, t \in T \mid \lambda_t : N \rightarrow \mathbb{R}^+\}$ , ένα σύνολο ρυθμών πυροδότησης (firing rates) σε συνάρτηση με το μαρκάρισμα (ένα σύνολο ακεραίων) και όπου κάθε στοιχείο σχετίζεται με μία μετάβαση  $t$ . Αυτός ο ρυθμός, ένας θετικός πραγματικός αριθμός από το  $\mathbb{R}^+$ , χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συνάρτησης πυκνότητας πιθανότητας για τη μετάβαση  $t$ .

### 3.5 Αξιολόγηση των Δικτύων Πέτρι

Αν και η χρήση των δικτύων Πέτρι καλύπτει ένα ευρύ φάσμα τεχνικών εφαρμογών, καθόσον η εργασία αυτή μελετά την εφαρμογή τους στα βιολογικά συστήματα, αξίζει να γίνει μια αξιολόγηση της χρήσης τους σε αυτό τον τομέα. Αφού παρουσιάστηκαν οι κυριότερες δομικές ιδιότητες που θα μπορούσαμε να μελετήσουμε, σε αυτό το σημείο θα δούμε συνοπτικά το είδος των βιολογικών προβλημάτων για τα οποία τα δίκτυα Πέτρι θα μπορούσαν να δώσουν λύσεις. Επίσης είναι χρήσιμο να γνωρίζουμε και τις αδυναμίες μοντελοποίησης τους έτσι ώστε να καθορίσουμε τα όρια των δυνατοτήτων τους στο χώρο της μοντελοποίησης των βιολογικών συστημάτων.

Τα βιολογικά συστήματα αποτελούνται από πολλές επιμέρους οντότητες οι οποίες έχουν συγκεκριμένη λειτουργία και αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Έτσι, η δυνατότητα ταυτοχρονίας κρίνεται ιδιαίτερα χρήσιμη στη μοντελοποίηση αυτών των συστημάτων. Σε ένα σύστημα μπορούν να διεξάγονται την ίδια χρονική στιγμή πολλαπλές διεργασίες με διαφορετικό ρυθμό ή κάθε μία. Θα ήταν αδύνατο να χρησιμοποιήσουμε ένα φορμαλισμό ο οποίος δεν είχε τη δυνατότητα

ταυτοχρονίας στη μοντελοποίηση ζωντανών συστημάτων. Ένα δεύτερο γνώρισμα των βιολογικών συστημάτων είναι απουσία ντετερμινιστικής συμπεριφοράς. Σε ένα κύτταρο για παράδειγμα όπου συμβαίνουν πολλές μεταβολές, οι μεταβολές δεν συμβαίνουν με ένα σταθερό ρυθμό αλλά οι διαδικασίες κυβερνώνται από μια τυχαιότητα.

Η επιλογή των δικτύων Πέτρι στη μοντελοποίηση και ανάλυση βιολογικών συστημάτων έχει πολλαπλά πλεονεκτήματα. Εν πρώτοις, τα δίκτυα Πέτρι επεκτείνονται εύκολα. Εφόσον επιπρόσθετες πληροφορίες γίνουν γνωστές μπορούν να εισαχθούν στο μοντέλο χωρίς να χρειαστεί να αλλάξει η δομή του ή να επαναπροσδιοριστεί σε μεγάλο βαθμό. Επιπλέον μέσω της ιεραρχικής δόμησης ενός μοντέλου, που προσφέρεται από αρκετά εργαλεία, μπορούμε να αποκρύψουμε λεπτομέρειες του μοντέλου και να επικεντρωθούμε στην κύρια λειτουργία του.

Ένας άλλος λόγος που θα μπορούσε κάποιος να επιλέξει τα δίκτυα Πέτρι μεταξύ και άλλων μαθηματικών εργαλείων είναι και η δυνατότητα γραφικής απεικόνισης. Ένα εικονικό μοντέλο είναι σίγουρα περισσότερο εύληπτο και κατανοητό από ένα μοντέλο γραμμένο με παραδοσιακή μαθηματική σημειογραφία. Ο δημιουργός του μοντέλου αλλά και οι λοιποί ενδιαφερόμενοι βλέποντας της εικόνα αντιλαμβάνονται ευκολότερα τη λειτουργία του και μπορούν να εντοπίσουν ευκολότερα τυχόν λάθη. Επιπρόσθετα, τα δίκτυα Πέτρι υποστηρίζονται από μια πληθώρα εργαλείων τα οποία θα παρουσιαστούν στη συνέχεια και τα οποία προσφέρουν τη δυνατότητα καθορισμού του μοντέλου με διάφορους τρόπους και τη διεξαγωγή αυτοματοποιημένων αναλύσεων.

Οι διάφορες επεκτάσεις των δικτύων Πέτρι που περιγράφηκαν έχουν ιδιαίτερες δυνατότητες και επομένως κάθε επέκταση υπερτερεί στη μοντελοποίηση κάποιων βιολογικών συστημάτων έναντι άλλων. Αν και μια πλουσιότερη επέκταση από μια άποψη θα μπορούσε να θεωρηθεί γενικά καταλληλότερη εντούτοις στο [19] τονίζεται ότι η αύξηση της εκφραστικότητας οδηγεί σε πολυπλοκότερα

μοντέλα τα οποία είναι δύσκολο να αναλυθούν μαθηματικά. Συνεπώς η επιλογή πρέπει να λαμβάνει υπόψη και αυτή την παράμετρο.

Στο ίδιο άρθρο ( [19] ) γίνεται μια προσπάθεια προσδιορισμού του βιολογικού σκοπού των επεκτάσεων. Στον πίνακα 3.5.1 παρατίθενται τρεις επεκτάσεις δικτύων Πέτρι και τα βιολογικά συστήματα που θα μπορούσαν να μοντελοποιήσουν. Η διάταξη του πίνακα δεν είναι καθοριστική και πολλές μελέτες έκαναν ανάλυση κατά τρόπο διαφορετικό από αυτό που φαίνεται στον πίνακα.

Τα χρωματισμένα δίκτυα Πέτρι, προσδίδουν μεγαλύτερη ευκολία μοντελοποίησης πολύπλοκων διεργασιών και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για ποιοτική ανάλυση. Η δυνατότητα διάκρισης των μάρκων είναι επίσης χρήσιμη στα βιολογικά δίκτυα μεταβολιτών όπου θα μπορούσαμε να ξεχωρίσουμε μεταβολίτες βάση της αλυσίδας αντιδράσεων στην οποία ανήκουν. Βεβαίως θα πρέπει να σημειωθεί ότι η ποιοτική μοντελοποίηση έχει το μειονέκτημα ότι πολύπλοκα μοντέλα δύνανται να παράξουν ένα τεράστιο γράφο καταστάσεων δυσχεραίνοντας έτσι τη διαδικασία ανάλυσης.

Τα υβριδικά και στοχαστικά δίκτυα Πέτρι προσφέρονται για ποσοτική ανάλυση και συνεπώς απαιτούν περισσότερα δεδομένα μοντελοποίησης. Ωστόσο η επιλογή μεταξύ των δυο μπορεί να καθοριστεί από τη φύση των επιθυμητών μοντέλων. Εάν το μοντέλο περιέχει ένα μικρό αριθμό μάρκων και μας ενδιαφέρει η ακριβής μεταβολή της συγκέντρωσης τότε η στοχαστική επέκταση κρίνεται καταλληλότερη. Εάν όμως έχουμε ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση μάρκων στο βιολογικό μοντέλο και θέλουμε να μοντελοποιήσουμε ταυτοχρόνως συνεχείς και διακριτές ποσότητες τα υβριδικά δίκτυα Πέτρι είναι καταλληλότερα.

| Επέκταση ΔΠ  | Σκοπός Μοντελοποίησης                                   | Τύπος Ανάλυσης | Τύπος Διαδικασίας                                 |
|--------------|---------------------------------------------------------|----------------|---------------------------------------------------|
| Χρωματισμένα | Ανάλυση βιολογικών ιδιοτήτων του συστήματος             | Ποιοτική       | Μεταβολισμός                                      |
| Στοχαστικά   | Προσομοίωση βιολογικού συστήματος με χαμηλή συγκέντρωση | Ποσοτική       | Οποιαδήποτε στοχαστική διεργασία                  |
| Υβριδικά     | Προσομοίωση βιολογικού συστήματος                       | Ποσοτική       | Μεταβολισμός, ρυθμιστικό δίκτυο, μεταγωγή σήματος |

**Πίνακας 3.5.1:** Αντιστοιχία των επεκτάσεων ΔΠ με βιολογικές εφαρμογές που θα μπορούσαν να μοντελοποιήσουν αποδοτικά

## Κεφάλαιο 4

### Μοντελοέλεγχος για Δίκτυα Πέτρι και Υπολογιστικά Εργαλεία

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| 4.1 Εισαγωγή στο Μοντελοέλεγχο                    | 41 |
| 4.2 Χρονικές Λογικές                              | 42 |
| 4.3 Η Γραμμική Χρονική Λογική (LTL)               | 44 |
| 4.4 Μοντελοέλεγχος στα Δίκτυα Πέτρι               | 46 |
| 4.5 Η Πιθανολογική Γραμμική Χρονική Λογική (PLTL) | 47 |
| 4.6 Εργαλεία Λογισμικού για Δίκτυα Πέτρι          | 48 |

#### 4.1 Εισαγωγή στο Μοντελοέλεγχο

Στη μοντελοποίηση συστημάτων κρίνεται αναγκαία η επικύρωση της ορθότητας ενός μοντέλου. Δια μέσου του ελέγχου ορθότητας, που ονομάζεται μοντελοέλεγχος, επιδιώκεται η αύξηση της εμπιστοσύνης της σωστής λειτουργίας του ως προς το σύστημα, το οποίο προσομοιώνει, και οι τρόποι για να το πετύχουμε αυτό είναι πολλοί. Η επικύρωση της ορθής λειτουργίας συστημάτων έχει ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών<sup>1</sup>. Στο κεφάλαιο αυτό γίνεται μια εισαγωγή στις χρονικές λογικές, την κύρια μορφή μοντελοελέγχου και περιγράφεται η λογική PLTL, η οποία εφαρμόστηκε για την επαλήθευση του βιολογικού μοντέλου της μελέτης. Τέλος παρουσιάζονται τέσσερα υπολογιστικά εργαλεία για δίκτυα Πέτρι τα οποία προσφέρουν αυτοματοποιημένο μοντελοέλεγχο.

Η δομική ανάλυση που περιγράφηκε στην τρίτη ενότητα είναι μια ποιοτική προσέγγιση μοντελοελέγχου. Η δομική ανάλυση δεν βασίζεται στη χρήση των χρονικών λογικών αλλά σε μια απλότερη ανάλυση του γραφου καταστάσεων.

---

<sup>1</sup> Ο έλεγχος ορθότητας εφαρμόζεται για την επαλήθευση ποικίλων συστημάτων όπως είναι τα υπολογιστικά συστήματα όπου ο στόχος είναι η εξάλειψη σφαλμάτων στα επίπεδα του υλικού και λογισμικού. Επίσης εφαρμόζεται στη δοκιμασία νέων τεχνολογικών προϊόντων όπως είναι τα κινητά τηλέφωνα, οικιακές συσκευές κτλ. Ο μοντελοέλεγχος κρίνεται ιδιαίτερα απαραίτητος για κρίσιμα συστήματα, δηλαδή συστήματα που εγείρουν θέματα ασφαλείας για ανθρώπινη χρήση όπως ηλεκτρονικές συσκευές σε αυτοκίνητα και αεροπλάνα και ιατρικά μηχανήματα.

Είναι μια εύκολη διαδικασία διότι υποστηρίζεται από αρκετά εργαλεία τα οποία πραγματοποιούν αυτόματα τον έλεγχο των ιδιοτήτων. Ωστόσο η δομική ανάλυση γίνεται δύσκολη όταν το μοντέλο δεν είναι οριοθετημένο καθόσον ο γράφος προσβασιμότητας δεν είναι πεπερασμένος. Εντούτοις είναι δυνατό να γίνει κάποια δομική ανάλυση από εργαλεία που υποστηρίζουν γράφους επικάλυψης και οι οποίοι δεν εξετάζονται στην παρούσα εργασία. Στο [20] οι M. Heiner και I. Koch προτείνουν μια τεχνική ανάλυσης σε αναλλοίωτες μεταβάσεις που μπορεί να εφαρμοστεί και σε μη οριοθετημένα δίκτυα Πέτρι.

## 4.2 Χρονικές Λογικές

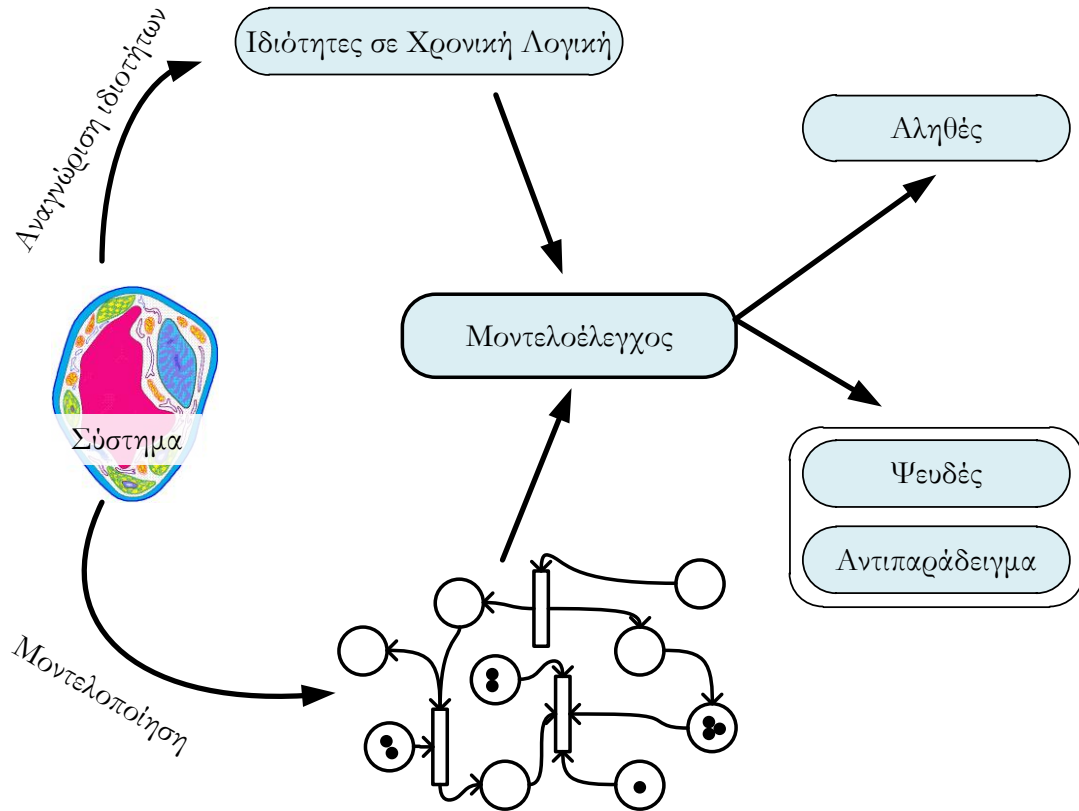
Ο μοντελοέλεγχος στηρίζεται στις χρονικές λογικές [21]. Οι χρονικές λογικές είναι μια μέθοδος διατύπωσης μαθηματικών εξισώσεων – ιδιοτήτων για την επαλήθευση συστημάτων. Υπάρχουν πάρα πολλές μορφές χρονικών λογικών και η κάθε μια έχει τη δική της σημασιολογία. Μια ιδιότητα  $\Phi$  σε χρονική λογική μπορεί να είναι αληθής ή ψευδής ανάλογα με την κατάσταση του συστήματος. Αυτό είναι σε αντίθεση με τη βασική, προτασιακή λογική όπου η τιμή αληθείας μιας ιδιότητας είναι στατική.

Στη χρονική λογική εξετάζεται η εξέλιξη ενός συστήματος σε συνάρτηση με το χρόνο. Σε κάθε χρονική μονάδα, βήμα, το σύστημα μεταβαίνει από την κατάσταση στην οποία βρίσκεται σε μια άλλη. Η συμπεριφορά της εξέλιξης του συστήματος είναι γνωστή για κάθε γεγονός που την προκαλεί. Έτσι η εξέλιξη του συστήματος μπορεί να θεωρηθεί ως ένα μονοπάτι το οποίο περιλαμβάνει όλες τις καταστάσεις από τις οποίες διήλθε, από την αρχική μέχρι την τελική. Στη χρονική λογική μια ιδιότητα  $\Phi$  μπορεί να έχει μια τιμή αληθείας για κάθε κατάσταση του μονοπατιού όχι όμως δυο τιμές ταυτόχρονα.

Η διαδικασία μοντελοελέγχου με χρονικές λογικές φαίνεται στην εικόνα 4.2.1 και έχει ως εξής: Πρώτα, το σύστημα πρέπει να μοντελοποιηθεί σε ένα

μοντέλο  $M$  χρησιμοποιώντας μια γλώσσα που να είναι συμβατή με τις χρονικές λογικές, δηλαδή σε μορφή μεταγωγής καταστάσεων. Στη συνέχεια, πρέπει να αναγνωριστεί η επιθυμητή συμπεριφορά του μοντέλου και να κωδικοποιηθεί υπό τη μορφή ιδιοτήτων  $\Phi$  σε μια χρονική λογική. Τέλος ο αλγόριθμος μοντελο-λέγχου με είσοδο το  $M$  και τις ιδιότητες  $\Phi$  αποφασίζει εάν οι ιδιότητες ικανοποιούνται στο μοντέλο.

Οι χρονικές λογικές διαχωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες : τις γραμμικές χρονικές λογικές και τις διακλαδωμένες χρονικές λογικές. Στις πρώτες, η εξέλιξη του συστήματος αποτελείται από ένα σύνολο ξεχωριστών μονοπατιών που περιλαμβάνουν όλες τις δυνατές αλληλουχίες καταστάσεων από τις οποίες μπορεί να διέλθει το σύστημα. Παραδείγματα χρονικών λογικών είναι οι LTL και PLTL. Στις διακλαδωμένες χρονικές λογικές, η εξέλιξη του συστήματος έχει τη μορφή ενός δένδρου όπου η ρίζα αντιστοιχεί στην αρχική κατάσταση και οι πιθανές μελλοντικές καταστάσεις σχηματίζουν ξεχωριστούς κλάδους του δένδρου. Παραδείγματα τέτοιων λογικών είναι οι CTL και CSL. Ιδιότητες γραμμένες στις δύο αυτές κατηγορίες μπορούν να αναφερθούν μέσω ειδικών τελεστών στην εξέλιξη των καταστάσεων του μοντέλου. Στις γραμμικές χρονικές λογικές οι ιδιότητες υπολογίζονται πάνω στο σύνολο των μονοπατιών του μοντέλου και επομένως μια ιδιότητα αληθεύει εάν αληθεύει σε όλες τις δυνατές εκτελέσεις. Από την άλλη οι διακλαδωμένες χρονικές λογικές παρέχουν τη σημασιολογία επικύρωσης μιας ιδιότητας στο υποσύνολο των μονοπατιών και επομένως μια ιδιότητα μπορεί να αληθεύει εάν ικανοποιεί κάποια μονοπάτια. Πάντως, αν και η εκφραστική δύναμη των δυο λογικών αλληλεπικαλύπτεται σε κάποιο βαθμό, εντούτοις δεν είναι ισοδύναμες.



**Εικόνα 4.2.1:** Διαδικασία επαλήθευσης συστήματος μέσω μοντελοελέγχου.

### 4.3 Η Γραμμική Χρονική Λογική (LTL)

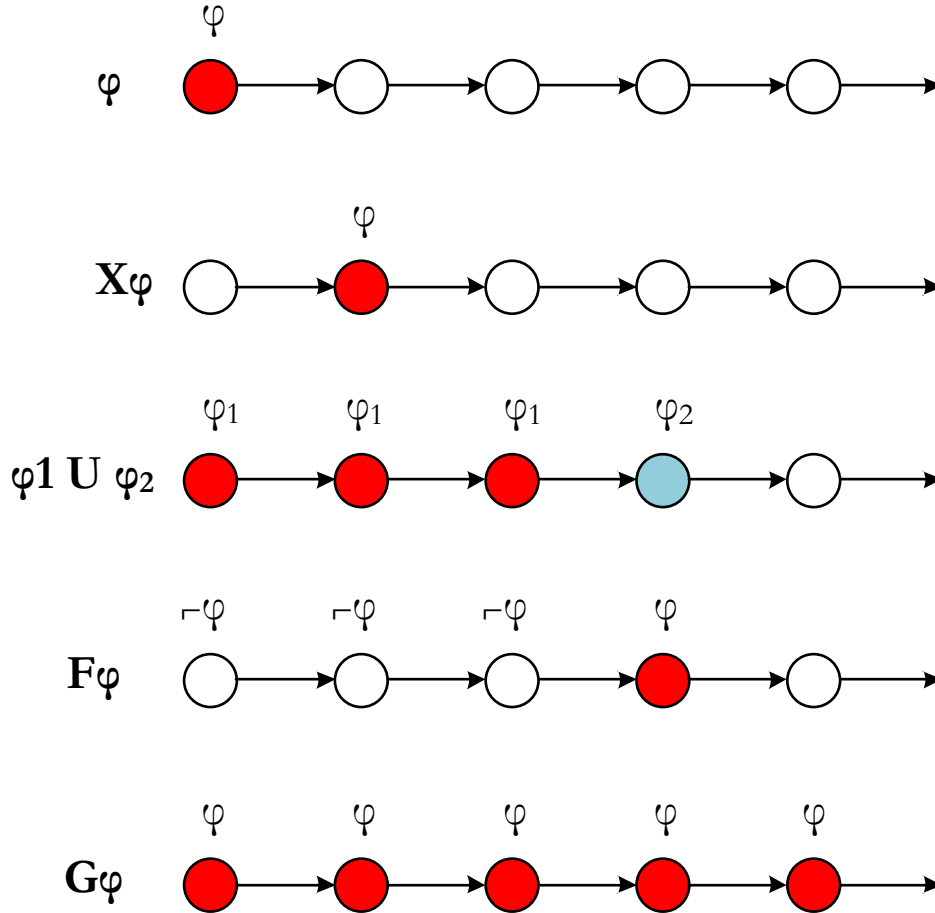
Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι γραμμικές χρονικές λογικές εξετάζουν σύνολα μονοπατιών (σειρές αλληλουχίας καταστάσεων) ενός μοντέλου για να διαπιστώσουν εάν μια ιδιότητα ικανοποιείται. Η LTL (Linear-Time Temporal Logic) είναι μια βασική γραμμική χρονική λογική. Έστω  $S$  το σύνολο των καταστάσεων του μοντέλου,  $\rightarrow$  το σύνολο των μεταβάσεων και  $L$  μια συνάρτηση αντιστοίχισης κάθε κατάστασης με μία ιδιότητα που ικανοποιεί. Ο ορισμός έχει ως ακολούθως :

**Ορισμός [21] :**

Έστω  $M = (S, \rightarrow, L)$  ένα μοντέλο και  $\pi = s_1 \rightarrow \dots$  ένα μονοπάτι του  $M$ . Η ικανοποίηση μίας LTL ιδιότητας  $\varphi$  για το  $\pi$  ορίζεται μέσω της σχέσης  $\models$  ως ακολούθως :

1.  $\pi \models T$
2.  $\pi \not\models \perp$
3.  $\pi \models p$  ανν  $p \in L(s_1)$
4.  $\pi \models \neg \varphi$  ανν  $\pi \not\models \varphi$
5.  $\pi \models \varphi_1 \wedge \varphi_2$  ανν  $\pi \models \varphi_1$  και  $\pi \models \varphi_2$
6.  $\pi \models \varphi_1 \vee \varphi_2$  ανν  $\pi \models \varphi_1$  ή  $\pi \models \varphi_2$
7.  $\pi \models \varphi_1 \rightarrow \varphi_2$  ανν  $\pi \models \varphi_2$  όποτε  $\pi \models \varphi_1$
8.  $\pi \models X\varphi$  ανν  $\pi^2 \models \varphi$
9.  $\pi \models G\varphi$  ανν για κάθε  $i \geq 1$ ,  $\pi^i \models \varphi$
10.  $\pi \models F\varphi$  ανν υπάρχει κάποιο  $i \geq 1$  τέτοιο ώστε  $\pi^i \models \varphi$
11.  $\pi \models \varphi U \Psi$  υπάρχει κάποιο  $i \geq 1$  τέτοιο ώστε  $\pi^i \models \Psi$  και για κάθε  $j = 1, \dots, i-1$  ισχύει ότι  $\pi^j \models \varphi$

Η σημασιολογία των τελεστών  $F$  (Feature),  $X$  (NeXt),  $U$  (Until) και  $G$  (Global) φαίνεται στην εικόνα 4.3.1.



**Εικόνα 4.3.1 :** Η σημασιολογία των χρονικών τελεστών της Γραμμικής Χρονικής Λογικής LTL

#### 4.4 Μοντελοέλεγχος στα Δίκτυα Πέτρι

Ο μοντελοέλεγχος με τη χρήση χρονικών λογικών μπορεί να εφαρμοστεί στα δίκτυα Πέτρι καθώς αυτά μπορούν να περιγραφούν ως συστήματα μεταγωγής καταστάσεων. Τα μονοπάτια για μοντελοέλεγχο μπορούν να ληφθούν από το γράφο προσβασιμότητας ( ενότητα 3.3.2 ) ο οποίος περιέχει όλες τις δυνατές καταστάσεις στις οποίες μπορεί να βρεθεί το μοντέλο. Ο μοντελοέλεγχος μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες [22] : αναλυτικός μοντελοέλεγχος και μοντελοέλεγχος με προσομοίωση.

Ο αναλυτικός μοντελοέλεγχος βασίζεται στην ανάλυση του γράφου καταστάσεων του δικτύου Πέτρι. Επομένως απαραίτητη προϋπόθεση για αυτόν τον

τύπο μοντελοελέγχου είναι ο γράφος προσβασιμότητας να έχει ένα πεπερασμένο αριθμό καταστάσεων ή ισοδύναμα το δίκτυο Πέτρι να είναι οριοθετημένο (ενότητα 3.3.4). Ωστόσο και αν ακόμα πληροúται αυτή η προϋπόθεση, υπάρχει ο κίνδυνος του προβλήματος της έκρηξης των καταστάσεων (state space explosion problem) το οποίο αναφέρεται στην παραγωγή ενός τεράστιου γράφου καταστάσεων ως αποτέλεσμα της ύπαρξης πάρα πολλών μαρκιών πάνω στις θέσεις του δικτύου. Σε αυτή την περίπτωση η εφαρμογή αναλυτικού μοντελοελέγχου δεν είναι υπολογιστικά εφικτή.

Ο μοντελοέλεγχος μέσω προσομοίωσης αποφεύγει αυτό το πρόβλημα και δεν προϋποθέτει την οριοθέτηση του δικτύου. Αυτό επιτυγχάνεται με την ανάλυση μόνο ενός υποσυνόλου του γράφου προσβασιμότητας ο οποίος κατασκευάζεται κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης του μοντέλου. Ωστόσο, συνέπεια αυτής της προσέγγισης είναι ότι μόνο γραμμικές χρονικές λογικές μπορούν να διατυπωθούν για τον έλεγχο ιδιοτήτων καθόσον το αποτέλεσμα της προσομοίωσης είναι ένα μοναδικό μονοπάτι. Πάνω σε αυτό το μονοπάτι θα επαληθευτεί μια ιδιότητα και δεν υπάρχουν εναλλακτικές επιλογές. Στην περίπτωση των στοχαστικών δικτύων Πέτρι μια επέκταση της LTL, η PLTL εφαρμόζεται στο μοντελοέλεγχο και έχει χρησιμοποιηθεί για τις ανάγκες της μελέτης.

#### 4.5 Η Πιθανολογική Γραμμική Χρονική Λογική (PLTL)

Η PLTL ( Probabilistic Linear-Time Logic) είναι μια επέκταση της LTL για μοντελοέλεγχο στοχαστικών μοντέλων. Πέραν από τους χρονικούς τελεστές της LTL χρησιμοποιεί και τον πιθανολογικό τελεστή  $P_{\triangleright\triangleleft p}[\varphi]$  όπου η πιθανότητα τα μονοπάτια να ικανοποιούν την ιδιότητα  $\varphi$  είναι  $\triangleright\triangleleft p$  με  $\triangleright\triangleleft \in <, \leq, =, \neq, >, \geq$ ) και  $p \in \mathbb{R}$ . Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ο τελεστής  $p =? [\varphi]$  ο οποίος επιστρέφει την πιθανότητα της ικανοποίησης της  $\varphi$ . Η πιθανότητα ικανοποίησης μια ιδιότητας υπολογίζεται ως εξής : Οι στοχαστικές προσομοιώσεις του μοντέλου παράγουν ένα σύνολο μονοπατιών. Κάθε μονοπάτι του συνόλου ελέγ-

χεται ως προς την ιδιότητα  $\varphi$ . Η πιθανότητα της ιδιότητας  $\varphi$  υπολογίζεται ως ο λόγος των μονοπατιών που ικανοποιούν την  $\varphi$  προς όλα τα μονοπάτια του συνόλου. Οι τελεστές στην PLTL είναι δυνατό να συνοδεύονται από χρονικούς περιορισμούς. Ακολουθούν ορισμένα παραδείγματα διατύπωσης ιδιοτήτων στην PLTL σε διασκευή από το [22] :

### Παραδείγματα PLTL :

**Ιδιότητα 1 :** Υπάρχουν προσβάσιμες καταστάσεις όπου η ERK είναι φωσφορυλιωμένη και RKIP δεν είναι.

$$P_{>0} [F(ERK_p \geq 1 + RKIP = 0)]$$

**Ιδιότητα 2 :** Η φωσφορυλίωση της ERK ( σε  $ERK_p$  ) είναι ανεξάρτητη της κατάστασης φωσφορυλίωσης της RKIP.

$$P_{\geq 1} [(RKIP_p = 0) \cup (ERK_p \geq 1)]$$

**Ιδιότητα 3 :** Ποια είναι η πιθανότητα η συγκέντρωση της  $RAF_p$  να αυξηθεί, όταν η αρχική της συγκέντρωση είναι L;

$$P_{=?} [(RAF_p = L) \cup (RAF_p > L) \{RAF_p = L\}]$$

Εδώ η έκφραση  $\{RAF_p = L\}$  λέγεται φίλτρο και μπορεί να επαναπροσδιορίσει την αρχική κατάσταση για σκοπούς ελέγχου της ιδιότητας.

## 4.6 Εργαλεία λογισμικού για δίκτυα Πέτρι

Έχουν αναπτυχθεί εργαλεία λογισμικού για ορισμό και ανάλυση δικτύων Πέτρι κυρίως από ερευνητικούς οργανισμούς και τμήματα πανεπιστημίων. Σε αυτή την ενότητα παρουσιάζονται τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη καθώς και μια συνοπτική παρουσίαση άλλων διαδομένων εργαλείων.

ων που χρησιμοποιούνται στη μοντελοποίηση βιολογικών συστημάτων για δίκτυα Πέτρι.

#### 4.6.1 CPN Tools

Το CPN Tools είναι ένα πακέτο λογισμικού που υποστηρίζει χρωματισμένα δίκτυα Πέτρι (ΧΔΠ). Είναι διαθέσιμο δωρεάν από : <http://cpntools.org/>. Αποτελεί μια προσπάθεια που ξεκίνησε το 2000 από το CPN Group στο Πανεπιστήμιο του Άρχους στη Δανία. Η αρχική ονομασία του πακέτου ήταν Design/CPN. Από το 2010 η ανάπτυξη του μεταφέρθηκε στο AIS Group του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου του Αϊντχόβεν στην Ολλανδία. Τα μάτια μπορεί να έχουν και τη διάσταση του χρόνου. Μία χρονισμένη μάτια δεν είναι διαθέσιμη μέχρι ο χρόνος της να γίνει ίσος ή μεγαλύτερος από το χρόνο προσομοίωσης. Η προσομοίωση μπορεί να γίνει με δύο τρόπους, διαδραστικά και αυτομάτως. Στη διαδραστική προσομοίωση ο χρήστης έχει πλήρη έλεγχο της λειτουργίας του μοντέλου και μπορεί να επιλέξει ποιες λειτουργίες θα ενεργοποιηθούν. Αντιθέτως στην αυτόματη προσομοίωση ο χρήστης καθορίζει τον αριθμό των βημάτων και ένας αλγόριθμος αναλαμβάνει την εκτέλεση των λειτουργιών. Σε αυτή την περίπτωση ο χρήστης μπορεί να θέσει συνθήκες ή σημεία τερματισμού.

Για την ανάλυση του μοντέλου χρησιμοποιείται η μέθοδος ανάλυσης στο χώρο καταστάσεων (ή διαφορετικά ο γράφος προσβασιμότητας). Εκτελεί ελέγχους όπως ο έλεγχος οριοθέτησης και ο έλεγχος ζωτικότητας. Αξιόλογο χαρακτηριστικό του είναι η υποστήριξη προηγμένης μεθοδολογίας κατασκευής του χώρου καταστάσεων προς αποφυγή της λεγόμενης έκρηξης του χώρου καταστάσεων που παρατηρείται σε μεγάλα μοντέλα. Ως προς τον μοντελοέλεγχο, το εργαλείο περιλαμβάνει μια βιβλιοθήκη για Λογική Δένδρου Υπολογισμού (CTL). Άλλες αξιοσημείωτες δυνατότητες είναι η ικανότητα γραφικής επικάλυψης του μοντέλου για περισσότερο ρεαλισμό στην παρουσίαση και συλλογή στατιστικών απόδοσης για την αξιολόγηση της απόδοσης του συστήματος. Το [16] χρησιμοποιεί το CPN Tools για την σταδιακή ανάπτυξη ενός ΧΔΠ και εισάγει τις έννοι-

ες και δυνατότητες του εργαλείου σταδιακά σε κάθε κεφάλαιο βοηθώντας τον αναγνώστη να αρχίσει να χρησιμοποιεί σε σύντομο χρόνο αποδοτικά το εργαλείο.

#### **4.6.2 Cell Illustrator**

Το Cell Illustrator (CI) είναι ένα εργαλείο που σχεδιάστηκε για αναπαράσταση και προσομοίωση των αλληλεπιδράσεων και των διεργασιών στα βιολογικά μονοπάτια. Αναπτύσσεται στο Πανεπιστήμιο του Τόκιο και διατίθεται από <http://genomicobject.net>. Παλαιότερα ονομαζόταν Genomic Object Net. Πλέον έχει εμπορικοποιηθεί από την εταιρεία GNI Group η οποία εξειδικεύεται σε βιοφάρμακα για τη θεραπεία του καρκίνου και φλεγμονωδών ασθενειών. Μια δοκιμαστική έκδοση είναι διαθέσιμη για χρήση σε απευθείας σύνδεση για περιορισμένο αριθμό ημερών.

Ο πυρήνας του εργαλείου είναι τα Υβριδικά Συναρτησιακά Δίκτυα Πέτρι (ΥΣΔΠ) όπου οι θέσεις και οι μεταβάσεις μπορούν να είναι είτε διακριτές είτε συνεχείς. Έχει ένα πολύ αξιόλογο γραφικό περιβάλλον και αρκετά εύχρηστο διότι δεν περιορίζεται στη παραδοσιακή σημειογραφία αλλά περιλαμβάνει σύμβολα από τη βιολογία. Μπορεί να εισάγει μοντέλα που είναι γραμμένα σε SBML, τη γλώσσα σήμανσης για βιολογικά συστήματα, και ως εκ τούτου είναι δυνατή η συνεργασία του με άλλα προγράμματα. Επιπλέον μπορεί να παρουσιάζει τα αποτελέσματα των προσομοιώσεων σε γραφικές παραστάσεις αφού ολοκληρωθεί η προσομοίωση ή σε πραγματικό χρόνο.

#### **4.6.3 Snoopy**

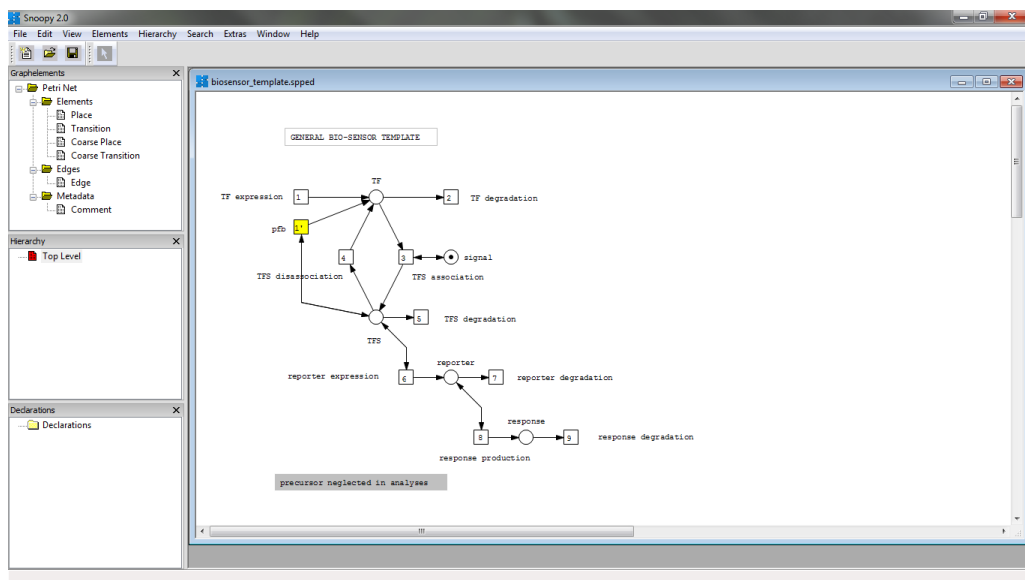
Το Snoopy είναι το εργαλείο το οποίο χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την έρευνα για την κατασκευή του βιολογικού μοντέλου. Η ομάδα ανάπτυξης του εργαλείου είναι το εργαστήριο «Δομών Δεδομένων και Αξιοπιστίας Λογισμικού» του τμήματος Πληροφορικής στο Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο του Κότμπους,

Γερμανία. Η χρήση του εργαλείου αποσκοπεί στην επαλήθευση τεχνικών συστημάτων, κυρίως συστημάτων λογισμικού, αλλά και την επαλήθευση φυσικών συστημάτων, όπως τα βιολογικά συστήματα στην προκειμένη περίπτωση. Διατίθεται δωρεάν από την ιστοσελίδα του εργαστηρίου <sup>1</sup> και τρέχει σε λειτουργικό σύστημα Windows, Linux(Ubuntu, Fedora) και Mac OS.

Κάτω από ένα ενοποιημένο πλαίσιο το Snoopy προσφέρει υποστήριξη για όλες τις δημοφιλείς επεκτάσεις δικτύων Πέτρι. Η εικόνα 3.6.1 δείχνει το περιβάλλον εργασίας του εργαλείου και στον πίνακα 3.6.1 παρουσιάζεται η λίστα των επεκτάσεων ΔΠ που υποστηρίζει το εργαλείο. Οι επεκτάσεις, όσον αφορά την υλοποίηση μοιράζονται την ίδια δομή αλλά εξειδικεύονται με διαφορετική κινητική συμπεριφορά η κάθε μία [23]. Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει την εύκολη μετατροπή μοντέλων από τον ένα τύπο στον άλλο. Στο αριστερό πλαίσιο του προγράμματος εμφανίζεται η εργαλειοθήκη μέσω της οποίας ο χρήστης εισάγει στον καμβά τα σύμβολα του μοντέλου όπως π.χ. τις θέσεις και τις ακμές. Εάν ο χρήστης έχει ανοικτά στην επιφάνεια εργασίας μοντέλα διαφορετικού τύπου τότε η εργαλειοθήκη αλλάζει δυναμικά όταν ο χρήστης μετακινείται από μοντέλο σε μοντέλο.

---

<sup>1</sup> <http://www-dssz.informatik.tu-cottbus.de/DSSZ/Software/Snoopy>



**Εικόνα 3.6.1** Το περιβάλλον εργασίας του Snoopy είναι απλό και εύχρηστο

| Κατάλογος Επεκτάσεων                 |
|--------------------------------------|
| Χρωματισμένα Δίκτυα Πέτρι            |
| Χρωματισμένα Επεκταμένα Δίκτυα Πέτρι |
| Χρωματισμένα Στοχαστικά Δίκτυα Πέτρι |
| Χρωματισμένα Συνεχής Δίκτυα Πέτρι    |
| Χρωματισμένα Υβριδικά Δίκτυα Πέτρι   |
| Συνεχή Δίκτυα Πέτρι                  |
| Επεκταμένο Δέντρο Σφαλμάτων          |
| Επεκταμένα Δίκτυα Πέτρι              |
| Δέντρο Σφαλμάτων                     |
| Δίκτυο Ελεύθερου Στυλ                |
| Υβριδικά Δίκτυα Πέτρι                |
| Συναρμολογήσιμα Δίκτυα Πέτρι         |
| Μουσικά Δίκτυα Πέτρι                 |
| MTBDD                                |
| MTIDD                                |
| Δίκτυα Πέτρι                         |
| Γράφος Προσβασιμότητας               |
| Στοχαστικά Δίκτυα Πέτρι              |
| Χρονισμένα Δίκτυα Πέτρι              |

**Πίνακας 3.6.1** Το εργαλείο υποστηρίζει ένα πλήθος από επεκτάσεις δικτύων Πέτρι και άλλες σχετικές δομές.

Ένα από τα αξιόλογα χαρακτηριστικά του εργαλείου είναι η δυνατότητα επέκτασης. Η ομάδα ανάπτυξης μπορεί να προσθέσει εύκολα επιπλέον τύπους επεκτάσεων χωρίς να επηρεαστεί η βασική αρχιτεκτονική του προγράμματος.

Άλλο αξιόλογο χαρακτηριστικό είναι η προσαρμοστικότητα του εργαλείου στους διάφορους τύπους μοντέλων. Όπως έχει λεχθεί, το περιβάλλον εργασίας αλλάζει δυναμικά και επιτρέπει την παράλληλη επεξεργασία διαφορετικών μοντέλων. Η υλοποίηση του προγράμματος είναι εξίσου εύστοχη καθώς επιτρέπει την εγκατάσταση του σε πολλές πλατφόρμες. Είναι γραμμένο στη γλώσσα προγραμματισμού C++ και χρησιμοποιεί τη βιβλιοθήκη wxWidgets<sup>1</sup>.

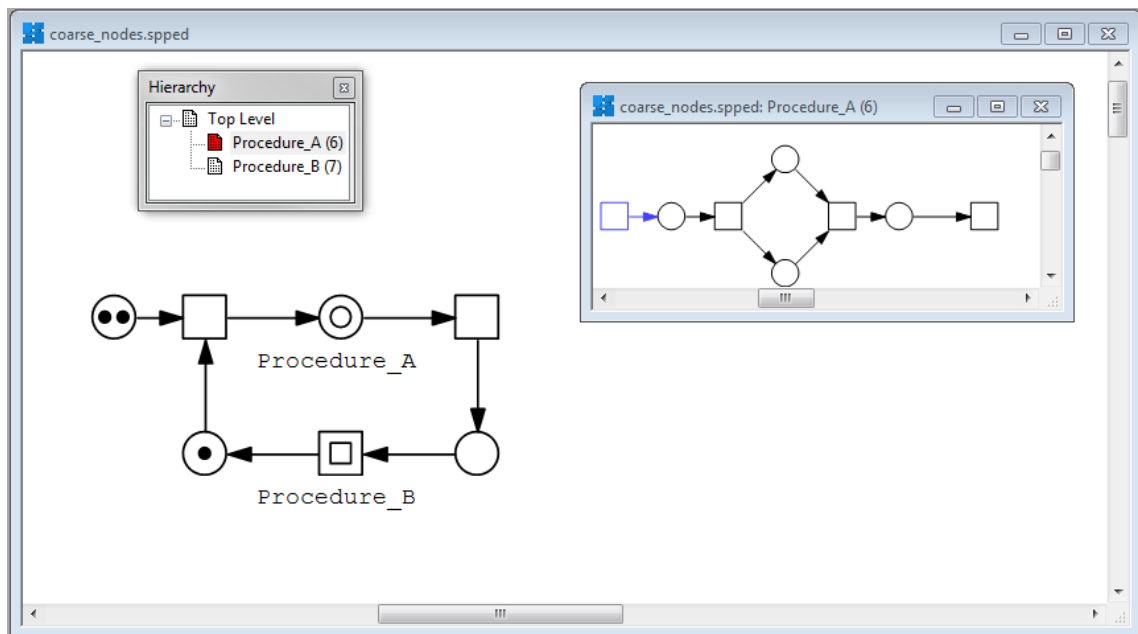
Μία από τις προκλήσεις των εργαλείων μοντελοποίησης είναι η οργανωτική διαχείριση μεγάλων μοντέλων. Τα μεγάλα μοντέλα μπορεί να περιλαμβάνουν εκατοντάδες κόμβους δυσχεραίνοντας την επεξεργασία τους από την πλευρά του χρήστη. Το Snoopy εφαρμόζει ιεραρχία για κάθε μοντέλο η οποία ορίζεται από το χρήστη. Η ιεράρχηση του μοντέλου σε επίπεδα γίνεται δια μέσου αδρών θέσεων (coarse places) και αδρών μεταβάσεων (coarse transitions). Μια αδρή θέση αποτελεί στην ουσία ένα υπό-μοντέλο του ευρύτερου σχεδιασμού. Ο χρήστης επιλέγει ένα υποσύνολο του μοντέλου και το αντικαθιστά με μια αδρή θέση ή μετάβαση αναλόγως. Η ιεραρχία είναι πολύ σημαντική λειτουργία καθώς τα επίπεδα αντιστοιχούν καλύτερα στην πολυεπίπεδη φύση των πραγματικών μοντέλων. Αυτό επιτρέπει στο χρήστη να επικεντρωθεί στη μελέτη ενός επιπέδου επιταχύνοντας την εύρεση σφαλμάτων.

Ένας επιπρόσθετος τρόπος οργάνωσης μεγάλων μοντέλων είναι η χρήση των λογικών κόμβων (θέσεων και μεταβάσεων). Για παράδειγμα, ο χρήστης μπορεί να πάρει μια θέση η οποία λαμβάνει μέρος σε ένα μεγάλο αριθμό αντιδράσεων, να δημιουργήσει αντίγραφα της θέσης και να τα διασκορπίσει στο μοντέλο του. Έτσι όλα τα αντίγραφα αποτελούν στην ουσία το ίδιο αντικείμενο. Οι θέσεις πρέπει να δηλωθούν ως λογικές θέσεις έτσι ώστε το εργαλείο να μπορεί να ανιχνεύσει εάν πρόκειται για λανθασμένη εισαγωγή του ιδίου ονόματος ή εάν πράγματι είναι μια εικονική θέση. Το πλεονέκτημα της πρακτικής με τους логи-

---

<sup>1</sup> <http://www.wxwidgets.org/>

κούς κόμβους είναι η διάσπαση ενός μεγάλου και σύνθετου μοντέλου. Σημειώνεται ότι η ιεραρχία σε αυτή την περίπτωση δεν επηρεάζεται. Στο βιολογικό μοντέλο που παρουσιάζεται στο επόμενο κεφάλαιο έγινε χρήση αυτής της πρακτικής.



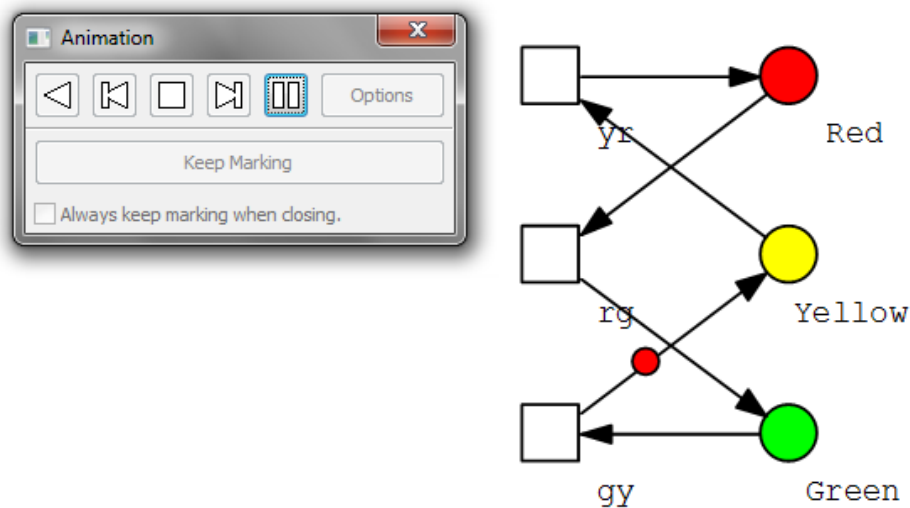
**Εικόνα 3.6.2 :** Απεικόνιση ενός μοντέλου με αδρές θέσεις και μεταβάσεις ( συμβολίζονται με διπλή εξωτερική γραμμή)

Ο κατασκευαστής ενός μοντέλου συνήθως βρίσκεται αντιμέτωπος με το επίπονο κομμάτι της μορφοποίησης του μοντέλου ώστε να είναι ευπαρουσίαστο και τακτοποιημένο. Λόγω του ότι η ανάπτυξη ενός μοντέλου είναι συνήθως μια σταδιακή διαδικασία επέκτασης, η μορφοποίηση του μοντέλου μπορεί να χαλάσει εύκολα. Το Snoopy παρέχει ένα μηχανισμό αυτόματης μορφοποίησης. Συγκεκριμένα διαθέτει τρεις αλγόριθμους μορφοποίησης : Planarization, FMMM και Sugiyama. Κάθε αλγόριθμος παράγει μια διαφορετική μορφοποίηση του μοντέλου. Έτσι αποφεύγονται διασταυρώσεις των ακμών και ακαταστασία των

κόμβων. Ο χρήστης μπορεί ακόμη να διαμορφώσει τον κάθε κόμβο ως προς το μέγεθος, την ονομασία και το χρώμα του.

Ένα μοντέλο που δημιουργείται στο Snoopy αποθηκεύεται σε διαφορετική μορφή αρχείου ανάλογα με τον τύπο του μοντέλου. Ωστόσο ο χρήστης μπορεί να εκμεταλλευτεί τη λειτουργία εξαγωγής και να αποθηκεύσει το μοντέλο σε μια άλλη μορφή αρχείου ούτως ώστε να προκαλέσει την αυτόματη μετατροπή του μοντέλου σε άλλο τύπο ΔΠ. Η λειτουργία εξαγωγής επιτρέπει και την αποθήκευση του μοντέλου σε μορφές που υποστηρίζονται από άλλα παρόμοια εργαλεία. Αυτή είναι μια πολύ χρήσιμη δυνατότητα διότι επιτρέπει τη χρήση του μοντέλου σε ποιο εξειδικευμένα εργαλεία και τη διεξαγωγή πειραμάτων που το Snoopy δεν υποστηρίζει. Η εξαγωγή συμπληρώνεται με τη λειτουργία της εισαγωγής όπου δημοφιλείς μορφές δεδομένων στο χώρο των ΔΠ όπως SBML και APNN μπορούν να εισαχθούν στο πρόγραμμα έστω και εάν δημιουργήθηκαν από άλλα εργαλεία.

Μια λειτουργία που βοηθά το χρήστη να κατανοήσει καλύτερα το μοντέλο του είναι η λειτουργία διαδραστικής προσομοίωσης (animation mode). Ο χρήστης αφού θέσει το πρόγραμμα σε αυτή τη λειτουργία μπορεί να τρέξει το μοντέλο και να βλέπει την ίδια ώρα τις αλλαγές που προκαλούνται σε αυτό. Στην εικόνα 3.6.3 παρουσιάζεται η λειτουργία διαδραστικής προσομοίωσης σε ένα μοντέλο για φώτα τροχαίας. Οι μετακινήσεις των μάρκων συμβολίζονται από κινούμενα κόκκινα μπαλάκια. Εάν ο χρήστης παύσει τη διαδραστική προσομοίωση, μπορεί να αλλάξει το μαρμάρισμα κάνοντας κλικ πάνω στις θέσεις. Επίσης μπορεί να προκαλέσει την πυροδότηση μιας μετάβασης κάνοντας κλικ πάνω στη μετάβαση. Αυτή η αλληλεπίδραση που αλλιώς λέγεται και παιχνίδι με μάρκας (token game) έχει σκοπό την κατανόηση και τον εντοπισμό λαθών του μοντέλου.

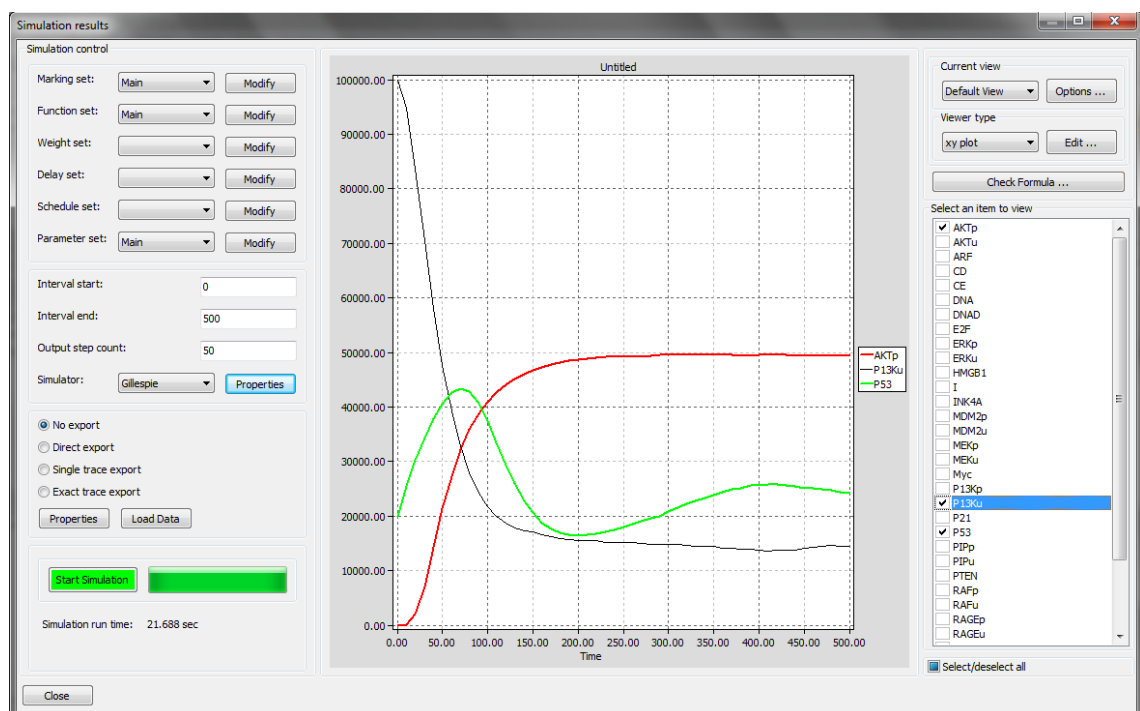


**Εικόνα 3.6.3 :** Η λειτουργία διαδραστικής προσομοίωσης σε δράση

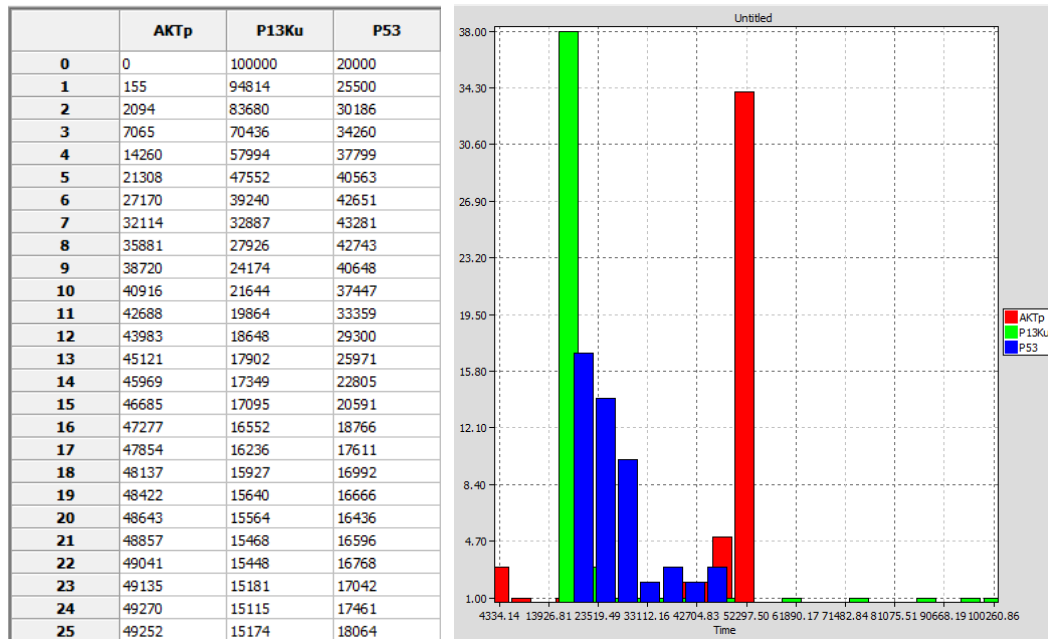
Εκτός από διαδραστική προσομοίωση το Snoopy περιλαμβάνει και ένα στοχαστικό προσομοιωτή. Ο στοχαστικός προσομοιωτής μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για μοντέλα με στοχαστικά χαρακτηριστικά. Η στοχαστική προσομοίωση βασίζεται στον αλγόριθμο του Gillespie ο οποίος προτάθηκε στο [18] και είναι γνωστός ως Στοχαστικός Αλγόριθμος Προσομοίωσης.

Για σκοπούς προσομοίωσης, ο χρήστης μπορεί να αποθηκεύσει σύνολα παραμέτρων που αφορούν το μοντέλο όπως για παράδειγμα το αρχικό μαρκάρισμα και ο ρυθμός αντιδράσεων. Έτσι για κάθε προσομοίωση μπορεί να επιλέγει κάθε φορά το σύνολο που επιθυμεί χωρίς να χρειάζεται να διαγράφει το προηγούμενο. Το γραφικό περιβάλλον του προσομοιωτή, που παρουσιάζεται στην εικόνα 3.6.4., χωρίζεται σε τρία μέρη. Στο αριστερό μέρος ο χρήστης μπορεί να καθορίσει τις επιλογές της προσομοίωσης. Πρώτα χρειάζεται να επιλέξει τα παραμετρικά σύνολα για την προσομοίωση. Στη συνέχεια μπορεί να ορίσει τη χρονική διάρκεια της προσομοίωσης καθώς και το ρυθμό δειγματοληψίας. Μπορεί ακόμη να επιλέξει να τρέχουν παράλληλα πολλές προσομοιώσεις του ίδιου μοντέλου. Τα αποτελέσματα σε αυτή την περίπτωση θα αποτελούνται από τον μέσο όρο όλων των προσομοιώσεων. Στο μέσο όπως φαίνεται και στην εικόνα, παρου-

σιάζονται τα αποτελέσματα υπό τη μορφή γραφικής παράστασης. Ο χρήστης επιλέγει από δεξιά τις θέσεις που θέλει να εμφανίζονται στη γραφική παράσταση. Η αυτόματη δημιουργία γραφικών παραστάσεων είναι πολύ χρήσιμο χαρακτηριστικό και είναι μια λειτουργία που δεν συναντάται συχνά σε παρόμοια εργαλεία. Ωστόσο, αντί γραφικών παραστάσεων ο χρήστης μπορεί να επιλέξει να εμφανιστούν τα αριθμητικά αποτελέσματα υπό μορφή πινάκων ή ιστογράμματος (εικόνα 3.6.5). Τέλος, υπάρχει δυνατότητα εξαγωγής των αποτελεσμάτων σε μορφή αρχείου csv για περαιτέρω επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε άλλα εργαλεία όπως Microsoft Excel κτλ.



**Εικόνα 3.6.4 :** Ο Στοχαστικός Προσομοιωτής του Snoopy μπορεί να παρουσιάσει τα αποτελέσματα σε μορφή γραφικών παραστάσεων στο τέλος μιας προσομοίωσης



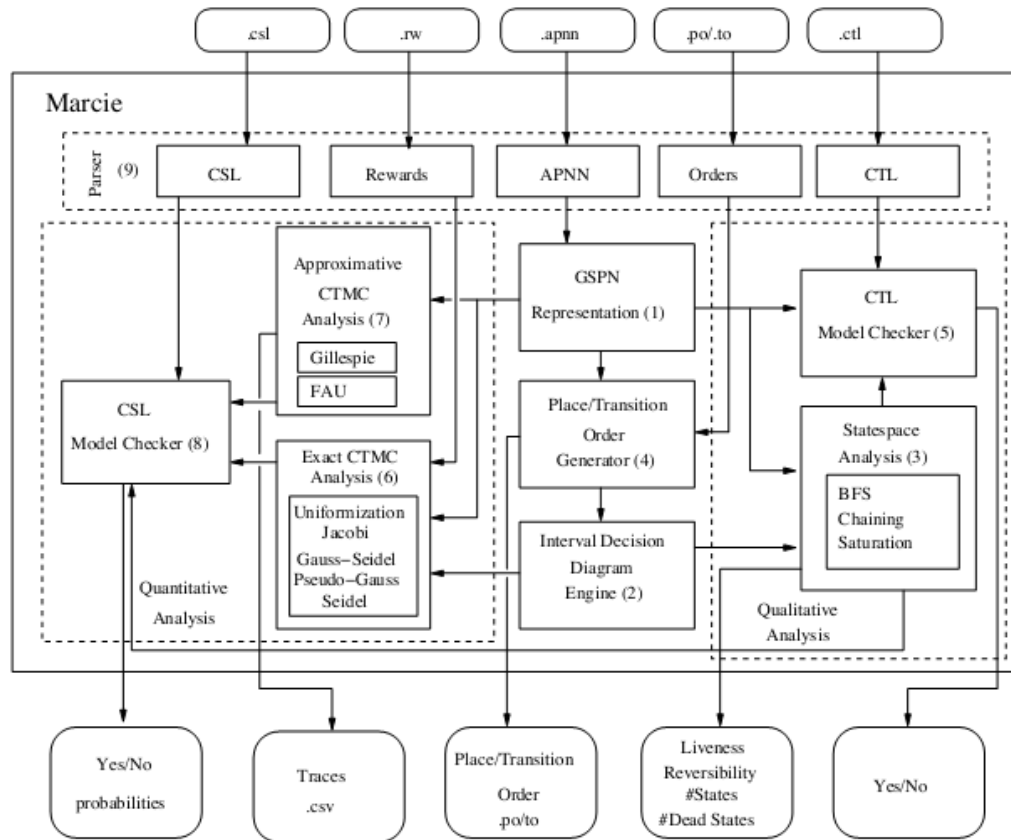
**Εικόνα 3.6.5 :** Τα αποτελέσματα μπορούν να εμφανιστούν ακόμη σε πίνακα ή σε μορφή ιστογράμματος.

Βάση της στοχαστικής προσομοίωσης μπορεί να ελεγχθεί η ορθότητα του μοντέλου μέσω μοντελοελέγχου. Συγκεκριμένα το εργαλείο υποστηρίζει ένα υποσύνολο της Πιθανολογικής Γραμμικής Χρονικής Λογικής (Probabilistic Linear-Time Logic). (βλέπε ενότητα 3.6) Στο ίδιο γραφικό περιβάλλον Στοχαστικής προσομοίωσης ο χρήστης μπορεί να ορίσει τις ιδιότητες που θέλει να ελέγξει και να τρέξει τον προσομοιωτή. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται με το πέρας της προσομοίωσης. Στην παρούσα μελέτη δεν έγινε χρήση του μοντελοελέγχου μέσω του Snoopy αλλά μέσω του εργαλείου που θα παρουσιαστεί στη συνέχεια και το οποίο υποστηρίζει πλήρως τη λογική PLTL.

#### 4.6.4 Marcie

Ένα άλλο εργαλείο που χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη είναι το Marcie. Το Marcie αναπτύσσεται από την ίδια ομάδα που έγραψε το Snoopy. Ωστόσο σε αντίθεση με το Snoopy, είναι ένα εργαλείο χωρίς δικό του γραφικό περιβάλλον αλλά είναι περισσότερο εξειδικευμένο στις ανάγκες μοντελοποίησης

βιολογικών συστημάτων. Υποστηρίζει την ανάλυση Γενικών Στοχαστικών Δικτύων Πέτρι (ΓΣΔΠ). Σε αντίθεση με τα σύνηθες Στοχαστικά ΔΠ, τα ΓΣΔΠ υποστηρίζουν άμεσες μεταβάσεις, δηλαδή μεταβάσεις που μπορούν να πυροδοτηθούν άμεσα όταν ενεργοποιηθούν. Η ανάλυση μπορεί να γίνει είτε ποιοτικά είτε ποσοτικά. Επιπλέον υπάρχει η δυνατότητα μοντελοελέγχου. Στην εικόνα 3.6.4.1 παρουσιάζεται η αρχιτεκτονική του Marcie



**Εικόνα 3.6.4.1** – Η Αρχιτεκτονική Δομή του Marcie από το [24]

Ένα από τα προβλήματα που αντιμετωπίζουν τα εργαλεία μοντελοποίησης είναι ότι στην προσπάθειά τους να κατασκευάσουν το γράφο προσβασιμότητας υποφέρουν από το πρόβλημα έκρηξης καταστάσεων (βλ. εν. 3.7.1). [24] Αυτό συνεπάγεται μια υψηλή οριοθέτηση για το μοντέλο. Ιδιαίτερα τα βιολογικά μοντέλα συνήθως παράγουν έναν μη οριοθετημένο γράφο προσβασιμότητας ο οποίος περιορίζει την ανάλυση σε προσεγγιστικές και προσομοιωτικές αναλύσεις. Μια προσπάθεια επίλυσης είναι η συμβολική προσέγγιση, όπως για παράδειγμα τα

Δυαδικά Διαγράμματα Αποφάσεων (Binary Decision Diagrams) τα οποία επιτρέπουν την ποιοτικό έλεγχο για μεγάλο αριθμό καταστάσεων.

Το εργαλείο βασίζεται πάνω σε Χρονικά Διαγράμματα Αποφάσεων (Interval Decision Diagrams). Ένα Χρονικό Διάγραμμα Αποφάσεων (ΧΔΑ) είναι ένας κατευθυνόμενος, ριζωμένος και χωρίς κύκλους γράφος ο οποίος αποτελείται από μη τερματικούς κόμβους με ετικέτες μεταβλητών και δύο τερματικούς κόμβους με ετικέτες 0 και 1. Αυτή η προσέγγιση καταφέρει να αντιμετωπίσει προβλήματα χαμηλής αποδοτικότητας στην ανάλυση. Σχετικά με τα Χρονικά Διαγράμματα Αποφάσεων καθώς για τους λόγους που είναι πιο αποδοτικά στον τομέα της μοντελοποίησης ο αναγνώστης μπορεί να ανατρέξει στο [25]. Η ανάλυση του χώρου καταστάσεων βασίζεται πάνω σε αυτά τα διαγράμματα. Το εργαλείο υλοποιεί τρεις αλγόριθμους για την κατασκευή του γράφου προσβασιμότητας. Οι δυο αλγόριθμοι βασίζονται σε κατά βάθος διερεύνηση του διαγράμματος (BFS) ενώ ένας τρίτος βασίζεται σε τεχνική κορεσμού (SAT).

Όσον αφορά την επικύρωση της ορθότητας, το Marcie περιλαμβάνει αλγόριθμους μοντελοελέγχου. Η Διακλαδωμένη Χρονική Λογική είναι μια τεχνική που μας επιτρέπει να ελέγξουμε εάν μια ιδιότητα ικανοποιείται ή όχι από μια δομή Kripke [21]. Ο γράφος προσβασιμότητας μπορεί να θεωρηθεί ως μια δομή Kripke στην οποία μπορούμε να εφαρμόσουμε μοντελοέλεγχο ( βλ. ενότητα μοντελοελέγχου )

Πέραν από την ποιοτική ανάλυση, το Marcie υποστηρίζει ποσοτική ανάλυση ΣΔΠ. Η ποσοτική ανάλυση στηρίζεται στον υπολογισμό των πιθανοτικών κατανομών της Συνεχούς-χρονικής αλυσίδας του Μαρκόφ, (Continuous-Time Markov Chain) μιας στοχαστικής διεργασίας από την θεωρία πιθανοτήτων. Ανάλυση και αλγόριθμοι των Συνεχών – Αλυσίδων του Μαρκόφ μπορούν να αναζητηθούν στο [26].

Το Marcie είναι γραμμένο σε C++. Διατίθεται δωρεάν για μη εμπορική χρήση από το <http://www-dssz.informatik.tu-cottbus.de/DSSZ/Software/Marcie>. Στην ιστοσελίδα εκτός από το εργαλείο, υπάρχει επίσης ένας λεπτομερής οδηγός και σχετικές δημοσιεύσεις. Η ομάδα ανάπτυξης παρέχει πολύ καλή υποστήριξη για το εργαλείο και οι χρήστες προτείνονται να αναφέρουν στην ομάδα τυχόν σφάλματα που εντοπίζουν ή εισηγήσεις για βελτίωση του προγράμματος. Παρόλο που το Marcie είναι ένα εργαλείο χωρίς γραφικό περιβάλλον, το Charlie, ένα άλλο εργαλείο της ίδιας ομάδας, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία γραφικού περιβάλλοντος για το Marcie έτσι ώστε ο χρήστης να μπορεί να ορίζει τις επιλογές εκτέλεσης και τα αρχεία εισόδου ευκολότερα. Το ΔΠ που δίδεται ως είσοδος στο εργαλείο πρέπει να είναι γραμμένο σε APNN μορφή. Ωστόσο ο χρήστης δεν απαιτείται να μάθει να γράφει μοντέλα σε αυτή τη μορφή καθώς άλλα εργαλεία, όπως το Snoopy, μπορούν να εξάγουν ένα μοντέλο σε μορφή APNN.

#### 4.6.5 Σύνοψη Εργαλείων

Στον παρακάτω πίνακα δίδεται η σύνοψη των χαρακτηριστικών των εργαλείων που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα.

| A/A | Ονομασία         | Επεκτάσεις                               | Τύπος Ανάλυσης                         | Μοντελοέλεγχος | Διαθεσιμότητα | Εκδότης                   | Λειτ. Σύστημα        |
|-----|------------------|------------------------------------------|----------------------------------------|----------------|---------------|---------------------------|----------------------|
| 1   | CPN Tools        | Χρωματισμένα ΔΠ                          | Διαδραστική και αυτόματη προσομοίωση   | CTL            | Δωρεάν        | AIS Group                 | Windows/Linux/Mac OS |
| 2   | Cell Illustrator | ΥΣΔΠ                                     | Διαδραστική και αυτόματη προσομοίωση   | -              | Εμπορικό      | Πανεπιστήμιο του Τόκιο    | Windows/Linux/Mac OS |
| 3   | Snoopy           | Χρωματισμένα, Στοχαστικά, Χρονισμένα κ.α | Διαδραστική και στοχαστική προσομοίωση | Υποσύνολο PLTL | Δωρεάν        | Πανεπιστήμιο του Κότμπους | Windows/Linux/Mac OS |
| 4   | Marcie           | Γενικοποιημένα Στοχαστικά ΔΠ             | Στοχαστική προσομοίωση                 | CSL,CTL, PLTL  | Δωρεάν        | Πανεπιστήμιο του Κότμπους | Linux/Mac OS         |

**Πίνακας 4.6.5 :** Συγκριτικός πίνακας δυνατοτήτων υπολογιστικών εργαλείων για Δίκτυα Πέτρι

# Κεφάλαιο 5

## Το Βιολογικό Μοντέλο

---

|                                          |    |
|------------------------------------------|----|
| 5.1 Εισαγωγή                             | 63 |
| 5.2 Μονοπάτια Σηματοδότησης του Μοντέλου | 65 |
| 5.3 Το μοντέλο στο Snopy                 | 70 |
| 5.4 Υπολογιστικά Αποτελέσματα            | 82 |
| 5.5 Επικύρωση του Μοντέλου               | 94 |

---

### 5.1 Εισαγωγή

Σκοπός του βιολογικού μοντέλου με το οποίο ασχοληθήκαμε είναι η μελέτη ορισμένων μονοπατιών σηματοδότησης που ξεκινούν από την πρωτεΐνη HBGB1 και τις πιθανότητες δημιουργίας καρκινικών όγκων στον άνθρωπο. Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ αυξημένης συγκέντρωσης της HMGB1 και της εμφάνισης καρκίνου καθώς προκαλεί ενεργοποίηση μονοπατιών που σχετίζονται με την επιτάχυνση του κυτταρικού κύκλου [27], [28]. Έρευνες που έχουν γίνει στο εργαστήριο ενισχύουν αυτό τον ισχυρισμό καθώς έδειξαν ότι η στοχευμένη απενεργοποίηση ή αποδυνάμωση της λειτουργίας της HMGB1 και του υποδοχέα της RAGE επάγει την απόπτωση και υποστέλλει την ανάπτυξη του καρκίνου του πάγκρεας [29].

### **Κυτταρικός Κύκλος**

Ο κυτταρικός κύκλος αναφέρεται γενικά στη λειτουργία διαίρεσης και πολλαπλασιασμού του κυττάρου. Ο κύκλος χωρίζεται σε τέσσερις φάσεις και η ενεργοποίηση της κάθε μιας εξαρτάται από την ολοκλήρωση της προηγούμενης. Στην πρώτη φάση ( φάση G1 ) το κύτταρο αυξάνεται σε μέγεθος και προετοιμάζεται για την αντιγραφή του γενετικού υλικού. Στη δεύτερη φάση ( φάση S ) το γενετικό υλικό του κυττάρου (DNA) αντιγράφεται και δημιουργείται ένα επιπλέον αντίγραφο το οποίο θα αποτελέσει το γενετικό υλικό του κυττάρου που θα δημιουργηθεί. Στην τρίτη φάση ( φάση G2 ) το κύτταρο συνεχίζεται να μεγαλώνει και προετοιμάζεται για την επόμενη φάση. Στην τέταρτη και τελευταία φάση ( φάση M ) το κύτταρο δεν μεγαλώνει πλέον και χρησιμοποιεί όλη του την ενέργεια για να διαιρεθεί. Η φάση αυτή ονομάζεται και μίτωση.

Η πρωτεΐνη HMGB1 απελευθερώνεται από νεκρά κύτταρα ή εκκρίνεται από ενεργούς μακροφάγους ( ένας τύπος λεμφοκυττάρων ) οι οποίοι κατακλύζονται αποπτωτικά (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος) τα κύτταρα. Μελέτες έχουν δείξει ότι η HMGB1 και οι κυτταρικοί υποδοχείς της εμπλέκονται στον καρκίνο και άλλες ασθένειες. Υπερέκφραση της πρωτεΐνης συναντάται σε διάφορους όγκους. Μελέτες έχουν δείξει ότι αφαίρεση ή μείωση της δραστηριότητας της πρωτεΐνης και του υποδοχέα της RAGE μπορούν να αυξήσουν την απόπτωση και να συστέλλουν την καρκινική ανάπτυξη των κυττάρων. Οι αλληλεπίδραση της HBGB1 με τους υποδοχείς της TLR και RAGE δεν είναι γνωστή στο μηχανικό επίπεδο και έτσι στο μοντέλο η RAGE αντιπροσωπεύει όλους του υποδοχείς προκειμένου να μειωθεί ο αριθμός των άγνωστων παραμέτρων.

## HMGB1

Η HMGB1 πρωτεΐνη (high-mobility group box 1 protein) η οποία εκκρίνεται από μακροφάγους, ώριμα δένδρεια κύτταρα και φυσιολογικά φωνικά κύτταρα ως ανταπόκριση σε τραυματισμούς, μολύνσεις και άλλα μολυσματικά γεγονότα [27]. Εντός του κυττάρου είναι υπεύθυνη για τη σταθεροποίηση των νουκλεοσωμάτων, για τη ρύθμιση και τη μεταγραφή πολλών γονιδίων.

Ένα κύτταρο δέχεται από το εξωτερικό περιβάλλον σήματα τα οποία προκαλούν αλυσιδωτές αντιδράσεις στο εσωτερικό του. Η ακολουθία των αντιδράσεων αποκαλείται στη βιολογία μονοπάτι μεταγωγής σήματος και έχει ως τελικό αποτέλεσμα ένα μόριο το οποίο μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση ενός γονιδίου. Στην παρούσα μελέτη, εξετάζονται τρία μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ενεργοποιούνται από την HMGB1. Τα μονοπάτια περιγράφονται στην ενότητα 4.2.

Τα δεδομένα για το μοντέλο λήφθηκαν από το [2], στο οποίο γίνεται μια μελέτη ορισμένων μονοπατιών σηματοδότησης που σχετίζονται με την HMGB1. Στο συγκεκριμένο άρθρο ένα υπολογιστικό μοντέλο γραμμένο στη γλώσσα BioNetGen προσομοιώνει τη λειτουργία και την αλληλεπίδραση των μονοπατιών. Κατά το συγγραφέα, είναι το πρώτο υπολογιστικό μοντέλο που ασχολείται με την έρευνα της συσχέτισης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης με τον καρκίνο. Ωστόσο, κατά παραδοχή του ιδίου, οι γνώσεις μας για την ακριβή μηχανική συμπεριφορά των μονοπατιών είναι περιορισμένες και επομένως η ακρίβεια του μοντέλου είναι αμφίβολη, όμως μπορεί κανείς εκ των αποτελεσμάτων να οδηγηθεί σε συγκεκριμένα πειράματα στο εργαστήριο για να τα επιβεβαιώσει.

### 5.2 Μονοπάτια Σηματοδότησης του μοντέλου

Σε αυτή την ενότητα περιγράφονται τα τρία μονοπάτια σηματοδότησης του μοντέλου από τα [2] και [30]. Η εικόνα 5.2.1 δείχνει μια γραφική αναπαράσ-

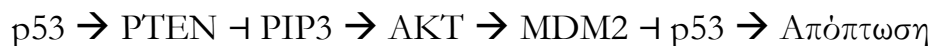
ταση αυτών των μονοπατιών. Στο τέλος γίνεται μια αναφορά για τον τρόπο που αυτά αλληλοεπηρεάζονται.

### Σηματοδοτικά Μονοπάτια

Η μετάδοση σημάτων είναι ένας τρόπος με τον οποίο το κύτταρο αντιδρά σε αλλαγές του εξωτερικού και εσωτερικού περιβάλλοντος προκειμένου να διατηρήσει μια φυσιολογική ισορροπία. Το σήμα αντίδρασης μεταφέρεται σε ένα υποδοχέα ο οποίος προκαλεί αντιδράσεις που ονομάζονται μεταγωγή σήματος. Κάθε τέτοιο μονοπάτι αντιδράσεων οδηγεί μια πληθώρα φυσιολογικών αλλαγών στο κύτταρο όπως κυτταρικό πολλαπλασιασμό, κυτταρικό θάνατο, κυτταρική διαφοροποίηση και αλλαγές στον μεταβολισμό.

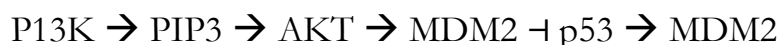
#### α) p53 – MDM2

Η πρωτεΐνη p53 είναι ένας ρυθμιστής του κύκλου ανάπτυξης του κυττάρου και προστατεύει τον οργανισμό από την ανάπτυξη όγκων. Από την άλλη η MDM2 πρωτεΐνη είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της p53. Μια αρνητική επαναληπτική ανάδραση (negative feedback loop) είναι ένα ρυθμιστικό βιολογικό κύκλωμα το οποίο επιβραδύνει μια βιολογική διαδικασία. Αντιθέτως μια θετική επαναληπτική ανάδραση τείνει να την επιταχύνει. Το μονοπάτι P53 – MDM2 ρυθμίζεται από μια θετική και μια αρνητική επαναληπτική ανάδραση. Η θετική επαναληπτική ανάδραση έχει ως εξής (όπου  $\rightarrow$  (= ενεργοποίηση / προαγωγή) και  $\dashv$  (= αναστολή / καταστολή) :



Η πρωτεΐνη P53 μπορεί να ρυθμίσει τη μεταγραφή της ογκοκατασταλτικής PTEN η οποία με τη σειρά της προκαλεί την υδρόλυση της PIP3 σε PIP2. Με αυτό τον τρόπο συστέλλεται η ενεργοποίηση των AKT και MDM2 οι οποίες αντιτάσσονται στην ευεργετική αντικαρκινική δράση της p53.

Η αρνητική επαναληπτική ανάδραση του μονοπατιού είναι:



Η HMGB1 προκαλεί την ενεργοποίηση της TLR2/4 (μια πρωτεΐνης που δεν μοντελοποιείται στην παρούσα μελέτη) η οποία ενεργοποιεί τη P13K. Η P13K φωσφορυλιώνει την PIP2 σε PIP3 ενώ η τελευταία φωσφορυλιώνει την AKT. Η μη φωσφορυλιωμένη ογκοπρωτεΐνη MDM2, η οποία λειτουργεί αρνητικά στη μεταγραφή της p53, μπορεί μόνο να βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Με τη φωσφορυλίωση της όμως από την AKT εισχωρεί στον πυρήνα του κυττάρου και ενώνεται με τη p53 προκαλώντας έτσι την καταστολή της. Στην εικόνα 5.3.2 το μονοπάτι φαίνεται όπως έχει μοντελοποιηθεί σε Δίκτυο Πέτρι.

### Φωσφορυλίωση

Φωσφορυλίωση είναι μια χημική αντίδραση στην οποία μία ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες προστίθενται σε ένα μόριο. Οι κινάσες είναι μια κατηγορία πρωτεϊνών που προκαλούν αυτή τη διαδικασία σε άλλες πρωτεΐνες ενώ οι φωσφοτάσες είναι πρωτεΐνες που προκαλούν την αποφωσφορυλίωση σε άλλες πρωτεΐνες. Πολλά ένζυμα και κυτταρικοί υποδοχείς ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται από αυτή τη διαδικασία.

### β) RAS – ERK

Όταν ο υποδοχέας RAGE ενεργοποιηθεί από την HMGB1 θα προκαλέσει ενεργοποίηση της RAS. Η RAS με τη σειρά της θα προκαλέσει φωσφορυλίωση της MEK πρωτεΐνης. Η ενεργοποιημένη MEK έχει την ιδιότητα να ενεργοποιεί την ERK έτσι ώστε αυτή να μετατοπιστεί μέσα στον πυρήνα. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση της ERK, κινάσες οι οποίες ρυθμίζουν τη μείωση/μίτωση του κυττάρου. Η ERK μπορεί να εισέλθει στον πυρήνα του κυττάρου και να ενεργοποιήσει πρωτεΐνες επιτάχυνσης του κυτταρικού κύκλου στη φάση G1 όπως οι Cyclin D και Myc. Στο [31] αναφέρεται ότι η K-RAS, ένα μέλος της οικογένειας RAS, έχει βρεθεί μεταλλαγμένη σε περισσότερο από 90% των καρκίνων του πάγκρεας. Έτσι το μονοπάτι σηματοδότησης έχει ως εξής:



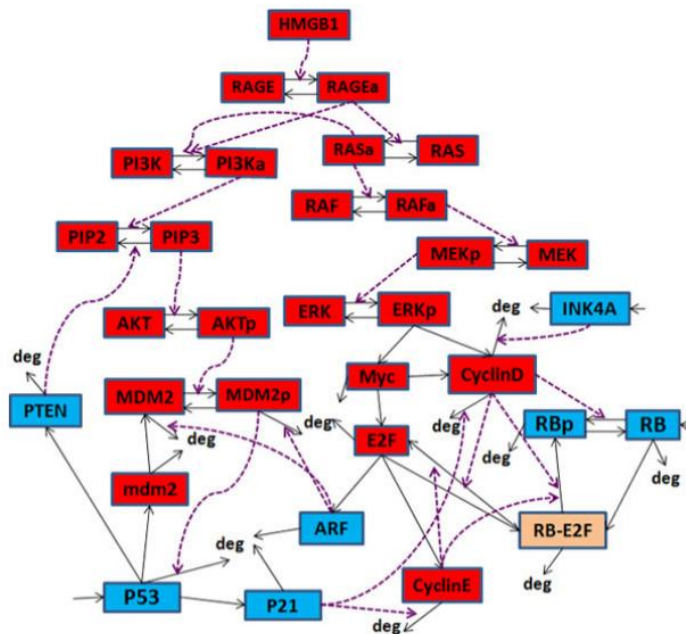
και η εικόνα 5.3.1 το παρουσιάζει σε Δίκτυο Πέτρι.

### γ) Rb – E2F

Το μονοπάτι Rb –E2F διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της G1/S φάσης του κυττάρου :



Αποτελεί μια θετική επαναληπτική ανάδραση που οδηγεί το κύτταρο από τη φάση G1 (ανάπτυξη) στη φάση S (αντιγραφή γενετικού κώδικα). Η E2F είναι ένας παράγοντας ο οποίος προκαλεί την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν την αντιγραφή του γενετικού υλικού και προωθούν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Η Rb από την άλλη είναι μια ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη η οποία περιορίζει τη δράση της E2F όντας ενωμένη μαζί της στο σύμπλοκο Rb-E2F. Ωστόσο οι ογκοπρωτεΐνες (σε μεταλλαγμένη μορφή) Cyclin D και Myc μπορούν να φωσφορυλιώσουν την Rb πράγμα που προκαλεί την ενεργοποίηση και απελευθέρωση της E2F από το σύμπλοκο. Έτσι η ελεύθερη E2F ενεργοποιεί τη μεταγραφή των Cyclin E και CDK2 οι οποίες οδηγούν το κύτταρο από τη φάση G1 στην S φάση. Η Cyclin E καταστέλλει τη δραστηριότητα της Rb οδηγώντας σε μια θετική επαναληπτική ανάδραση. Εναντία στη δράση της Cyclin D βρίσκεται η INK4A η οποία είναι ογκοκατασταλτική και σύμφωνα με το [32] είναι ανενεργή μέχρι και στο 90% των καρκίνων του πάγκρεας. Το μονοπάτι σε μορφή Δικτύων Πέτρι παρουσιάζεται στην εικόνα 5.3.3 .



**Εικόνα 5.2.1:** Σχεδιάγραμμα από το [2] που παρουσιάζει τα σηματοδοτικά μονοπάτια και την αλληλεπίδραση που έχουν μεταξύ τους.

### Αλληλεπίδραση των μονοπατιών σηματοδότησης

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια δεν λειτουργούν ανεξάρτητα αλλά το ένα επηρεάζει το άλλο. Στην εικόνα 5.2.1 παρουσιάζονται σε σχεδιάγραμμα τα μονοπάτια του μοντέλου και η μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Οι πρωτεΐνες των οποίων η συμπεριφορά οδηγεί στη ραγδαία εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου και στη δημιουργία όγκων εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα ενώ με μπλε χρώμα εμφανίζονται οι ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες. Η ογκοπρωτεΐνη RAS μπορεί να ενεργοποιήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι PI3K – AKT. Η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη ARF ενεργοποιημένη από την E2F μπορεί να ενωθεί με την MDM2 για να ενισχύσει την γρήγορη καταστολή της και να σταθεροποιήσει την p53 με αποτέλεσμα την απόπτωση. Στην ίδια εικόνα εμφανίζεται και η p21 πρωτεΐνη η οποία αναστέλλει την είσοδο στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Στο μοντέλο η p21 αναπαριστά την ίδια αλλά και την FBXW7. Η p21 και η FBXW7 έχουν παρατηρηθεί πειραματικά πως καταστέλλουν τη δραστηριότητα των κινασών Cyclin.

### 5.3 Το μοντέλο στο Snoopy

Το μοντέλο βασίζεται στο αντίστοιχο μοντέλο γραμμένο στη γλώσσα BioNetGen από το [2]. Η BioNetGen είναι ένα εργαλείο λογισμικού για μοντελοποίηση βάση κανόνων [33]. Στη γλώσσα BioNetGen (BNGL) ο δημιουργός του μοντέλου ορίζει κανόνες συμπεριφοράς μέσα από πέντε ομάδες δεδομένων. Οι ομάδες, που απαρτίζουν τη δομή ενός BNGL αρχείου είναι :

1. Παράμετροι
2. Μόρια [προαιρετικό]
3. Βιολογικά Είδη
4. Κανόνες Αντιδράσεων
5. Είδη προς παρατήρηση

Οι ομάδες μπορούν να εμφανίζονται με οποιαδήποτε σειρά στο αρχείο. Η ομάδα των παραμέτρων περιλαμβάνει τις αρχικές συγκεντρώσεις των ουσιών (χωρίς μονάδες μέτρησης) και κινητικές παραμέτρους, δηλαδή παραμέτρους που χρησιμοποιούνται στους κανόνες αντιδράσεων. Η ομάδα των Μορίων, η οποία μπορεί να παραληφθεί, προσδιορίζει ένα σταθμισμένο άθροισμα των ειδών που χρησιμοποιούνται. Στην ομάδα των βιολογικών ειδών ο χρήστης ορίζει τα είδη που απαρτίζουν το μοντέλο του, κάτι αντίστοιχο δηλαδή με τις θέσεις των δικτύων Πέτρι, και αντιστοιχεί κάθε είδος με την αρχική του συγκέντρωση η οποία ορίστηκε στην ομάδα των παραμέτρων. Οι κανόνες αντίδρασης είναι κανόνες που έχουν ορισμένη σύνταξη και περιγράφουν τις στοιχειομετρικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο μοντέλο. Οι κανόνες περιγράφονται υπό τον τύπο αντιστρέψιμης μάζας-αντίδρασης<sup>1</sup> (mass-action). Η ομάδα των ειδών προς παρατήρηση επιτρέπει στο χρήστη να καθορίσει τα είδη για τα οποία θέλει να εξαχθούν στατιστικά στοιχεία όταν διεξάγονται προσομοιώσεις. Το σύστημα λο-

---

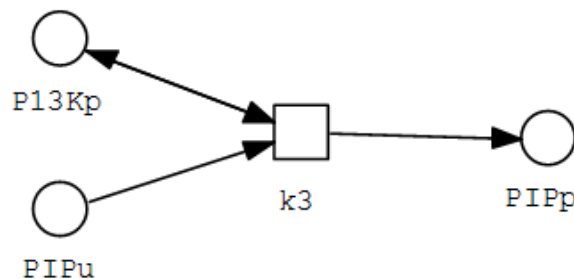
<sup>1</sup> Ο Νόμος της Μάζας – Αντίδρασης (mass – action) ορίζει ότι ο ρυθμός μετατροπής της μάζας σε γενικές χημικές αντιδράσεις είναι ανάλογος στα προϊόντα των μαζών των αντιδρώντων στοιχείων.

γισμικού της BioNetGen βρίσκεται στο <http://bionetgen.org> ενώ ένας χρήσιμος οδηγός για να ξεκινήσει κανείς να το χρησιμοποιεί είναι το [33].

Για παράδειγμα ο πέμπτος κανόνας ο οποίος βρίσκεται στο μονοπάτι της P53 :



δηλώνει ότι η φωσφορυλιωμένη PI3K μαζί με τη μη φωσφορυλιωμένη PIP προκαλεί τη φωσφορυλίωση της PIP. Ο κανόνας επίσης δηλώνει ότι η αντίδραση δεν θα επηρεάσει τη συνολική ποσότητα της PI3K. Ο ρυθμός με τον οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση μάζας – αντίδρασης είναι  $k3$  που είναι ορισμένος στην ομάδα παραμέτρων ως  $3 \cdot 10^{-6}$ . Σε ένα αντίστοιχο μοντέλο Δικτύων Πέτρι θα χρειαζούμε δυο θέσεις οι οποίες θα αναπαριστούν τις οντότητες PI3Kp και PIP. Στην BioNetGen είναι δυνατή η μεταβολή των καταστάσεων ενός μορίου. Για παράδειγμα μια οντότητα μπορεί να έχει τον παράγοντα φωσφορυλίωσης μια χρονική στιγμή και να τον απολέσει σε μια άλλη. Στα δίκτυα Πέτρι κατασκευάζουμε ξεχωριστές θέσεις για να το πετύχουμε αυτό. Έτσι, αντί της PIP θα χρειαζούμε δυο θέσεις για κάθε κατάσταση : τις PIPp και PIPu. Η αντίδραση θα γίνεται δια μέσου μιας μετάβασης. Στην εικόνα 5.3 φαίνεται η απεικόνιση του κανόνα σε μορφή δικτύου Πέτρι.



**Εικόνα 5.3** – Η αναπαράσταση του κανόνα φωσφορυλίωσης της PIP σε μοντέλο ΔΠ.

Η κατασκευή του μοντέλου βασίστηκε στα μονοπάτια που περιγράφθηκαν στην ενότητα 5.2 και ιδιαίτερα στον κώδικα BioNetGen του άρθρου [2] ο οποίος δίδει όλες τις λεπτομέρειες του μοντέλου. Ακολουθούν τμήματα του κώδικα από το άρθρο και η αντίστοιχη μοντελοποίηση τους σε δίκτυα Πέτρι.

Οι θέσεις του μοντέλου που είναι σκιασμένες σε γκριζο χρώμα είναι λογικές θέσεις για τις οποίες έχει γίνει λόγος στην ενότητα 4.7.3. Οι λογικές θέσεις υπήρξαν ιδιαίτερα βοηθητικές και επέτρεψαν τη ξεχωριστή απεικόνιση κάθε μονοπατιού σηματοδότησης. Οι εικόνες που ακολουθούν λήφθηκαν απευθείας από το Snoopy. Το Snoopy παρουσιάζει την αρχική συγκέντρωση των θέσεων σε κάθε θέση. Οι θέσεις στις οποίες δεν αναγράφεται κάποιος αριθμός έχουν μηδενική αρχική ποσότητα. Επιπλέον κάποιες μεταβάσεις εμφανίζονται με κόκκινο περίγραμμα. Αυτές είναι μεταβάσεις που μειώνουν την ποσότητα μιας πρωτεΐνης μεταφέροντας τις μάρκες στη θέση thrash. Η θέση thrash μπορούσε να παραληφθεί ( αφήνοντας τις μεταβάσεις χωρίς θέσεις εξόδου ) αλλά συμπεριλήφθηκαν για καλύτερη αντιστοίχιση του κώδικα BioNetGen με το μοντέλο.

#### α) ERK-RAS Σηματοδοτικό Μονοπάτι

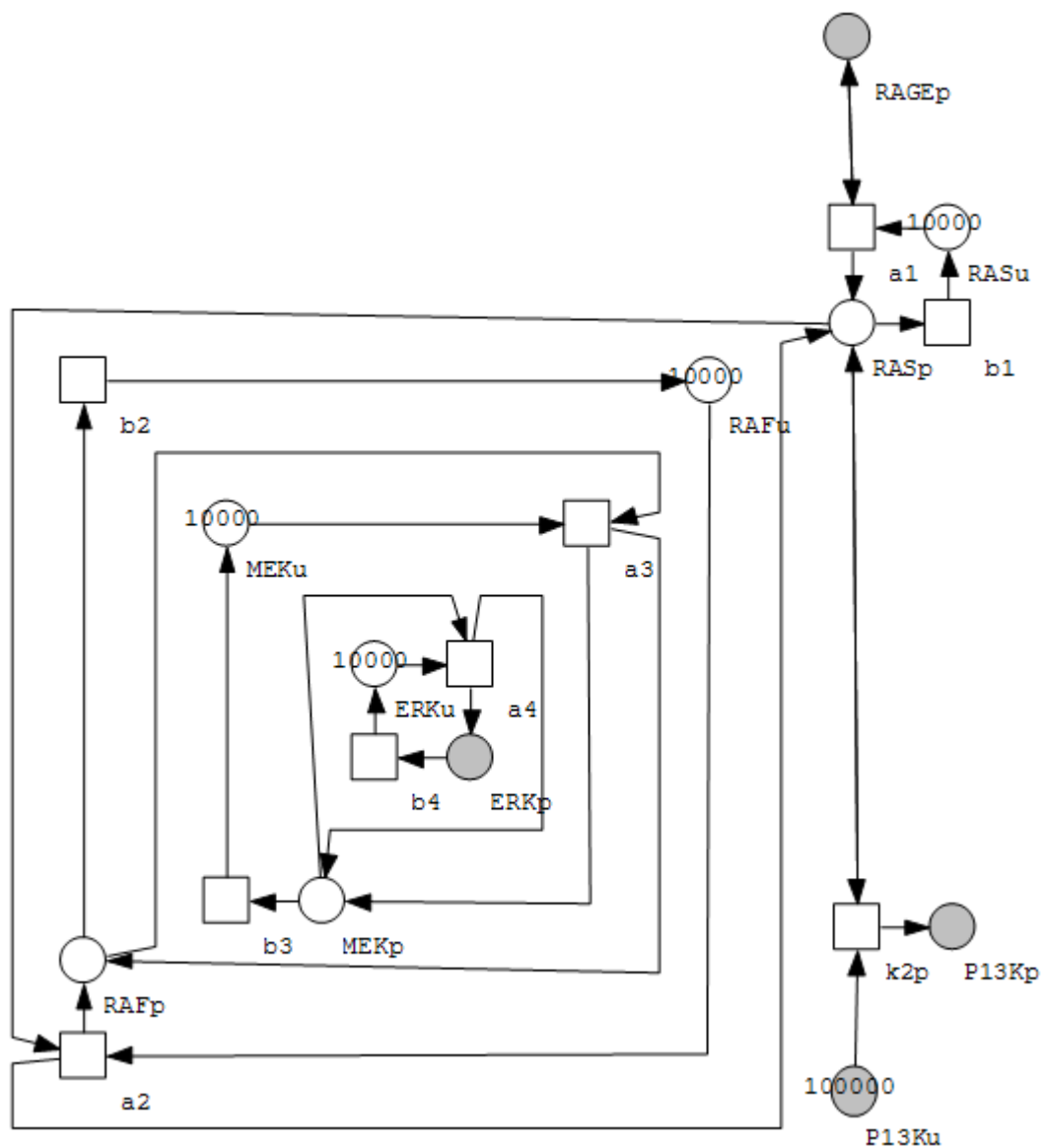
Οι κανόνες της BioNetGen για αυτό το μονοπάτι έχουν ως εξής :

| Κανόνας                                         | Ρυθμός Αντίδρασης |
|-------------------------------------------------|-------------------|
| 1. RAGE(a~p) + RAS(f~U) -> RAGE(a~p) + RAS(f~p) | a1                |
| 2. RAS(f~p) + PI3K(b~U) -> RAS(f~p) + PI3K(b~p) | k2p               |
| 3. RAS(f~p) -> RAS(f~U)                         | b1                |
| 4. RAS(f~p) + RAF(g~U) -> RAS(f~p) + RAF(g~p)   | a2                |
| 5. RAF(g~p) -> RAF(g~U)                         | b2                |
| 6. RAF(g~p) + MEK(h~U) -> MEK(h~p) + RAF(g~p)   | a3                |

| Κανόνας                                                                                                                                                  | Ρυθμός Αντίδρασης |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 7. $\text{MEK}(\text{h}\sim\text{p}) \rightarrow \text{MEK}(\text{h}\sim\text{U})$                                                                       | b3                |
| 8. $\text{ERK}(\text{i}\sim\text{U}) + \text{MEK}(\text{h}\sim\text{p}) \rightarrow \text{MEK}(\text{h}\sim\text{p}) + \text{ERK}(\text{i}\sim\text{p})$ | a4                |
| 9. $\text{ERK}(\text{i}\sim\text{p}) \rightarrow \text{ERK}(\text{i}\sim\text{U})$                                                                       | b4                |

**Πίνακας 5.3.1 :** Κανόνες για το ERK –RAS μονοπάτι

Το μοντέλο όπως λήφθηκε από το εργαλείο βρίσκεται στην εικόνα που ακολουθεί. Για κάθε κατάσταση πρωτεΐνης από τον παραπάνω πίνακα χρειάστηκε μια ξεχωριστή θέση. Οι μεταβάσεις έχουν ως αναγνωριστικό το ρυθμό αντίδρασης για ευκολότερη αντιπαράβολή με τον κώδικα.



Εικόνα 5.3.1 – ERK-RAS Σηματοδοτικό Μονοπάτι

### β) P53 – MDM2 Σηματοδοτικό Μονοπάτι

Οι κανόνες της BioNetGen για αυτό το μονοπάτι έχουν ως εξής :

Κανόνας

Ρυθμός Αντίδρασης

1.  $PI3K(b \sim p) + PIP(c \sim U) \rightarrow PI3K(b \sim p) + PIP(c \sim p)$   $k3$

| Κανόνας                                         | Ρυθμός Αντίδρασης |
|-------------------------------------------------|-------------------|
| 2. PTEN + PIP(c~p) -> PTEN + PIP(c~U)           | d3                |
| 3. PIP(c~p) + AKT(d~U) -> PIP(c~p) + AKT(d~p)   | k4                |
| 4. AKT(d~p) -> AKT(d~U)                         | d4                |
| 5. AKT(d~p) + MDM2(e~U) -> AKT(d~p) + MDM2(e~p) | k8                |
| 6. MDM2(e~p) -> MDM2(e~U)                       | d8                |
| 7. MDM2(e~U) -> Trash()                         | d7                |
| 8. MDM2(e~p) -> Trash()                         | d8p               |
| 9. mdm2t -> mdm2t + MDM2(e~U)                   | k7                |
| 10. mdm2t -> Trash()                            | d7                |
| 11. DNAD + MDM2(e~p) -> DNAD                    | Hill(dm1,h0,n2)   |
| 12. P53 -> P53 + mdm2t                          | Hill(k6,Kb,n3)    |
| 13. I() -> I() + P53                            | k9                |
| 14. P53 -> Trash()                              | d9                |
| 15. MDM2(e~p) + P53 -> MDM2(e~p)                | d9p               |
| 16. P53 -> P53+ PTEN                            | Hill(k5,Ka,n3)    |
| 17. PTEN -> Trash()                             | d5                |
| 18. P53 -> P53 + P21                            | Hill(k10,Kc,n2)   |
| 19. P21 -> Trash()                              | d10               |
| 20. P53 + DNAD -> P53 + DNA                     | Hill(g0,v0,n2)    |

**Πίνακας 5.3.2 :** Κανόνες για το ERK –RAS μονοπάτι

Το p53 – MDM2 μονοπάτι φαίνεται στην επόμενη εικόνα. Όπως φαίνεται και στον παραπάνω πίνακα αντιδράσεων κάποιες αντιδράσεις έχουν ρυθμό Hill. Η εξήγηση των αντιδράσεων Hill δίδεται στο σχετικό πληροφοριακό κουτί που ακολουθεί. Η αντίδραση Hill στη BioNetGen είναι μια συνάρτηση με τρεις παραμέτρους Hill(k,K,n) και μεταφράζεται ως εξής :

$$\frac{k \cdot x_1^n}{K^n + x_1^n} * x_2$$

Για παράδειγμα ο ρυθμός αντίδρασης Hill(dm1,h0,n2) του 11<sup>ου</sup> κανόνα από τον παραπάνω πίνακα εισήχθηκε στο Snoopy ως :

$$((dm1*DNAD^n2)/(h0^n2+DNAD^n2))*MDM2p$$

Το Snoopy δεν υποστηρίζει άμεσα τις αντιδράσεις Hill. Ο τύπος για τη λειτουργία της συνάρτησης Hill μας δόθηκε από εκπρόσωπο της ομάδας ανάπτυξης της γλώσσας BioNetGen.

#### Αντιδράσεις Hill

Η αντίδραση Hill είναι μια κλασσική μέθοδος για να περιγραφεί το φαινόμενο της συνεργατικής δέσμευσης ( cooperative binding ) [12, p. 169]. Ένα βιολογικό μόριο μπορεί να έχει πολλές θέσεις πρόσδεσης. Όταν κάποιο άλλο μόριο προσδεθεί σε αυτό μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη δομή του μορίου. Η νέα δομή μπορεί να είναι περισσότερο προσβάσιμη για άλλα μόρια απ' ότι ήταν προηγουμένως. Έτσι η πρόσδεση νέων μορίων γίνεται ολοένα και πιο γρήγορα ενόσω περισσότερα μόρια προστίθενται σε αυτή τη δομή.



### γ) Rb – E2F Σηματοδοτικό Μονοπάτι

Οι κανόνες της BioNetGen για αυτό το μονοπάτι έχουν ως εξής :

| Κανόνας                                                                        | Ρυθμός Αντίδρασης |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1. $PI3K(b \sim p) + PIP(c \sim U) \rightarrow PI3K(b \sim p) + PIP(c \sim p)$ | k3                |
| 2. $PTEN + PIP(c \sim p) \rightarrow PTEN + PIP(c \sim U)$                     | d3                |
| 3. $PIP(c \sim p) + AKT(d \sim U) \rightarrow PIP(c \sim p) + AKT(d \sim p)$   | k4                |
| 4. $AKT(d \sim p) \rightarrow AKT(d \sim U)$                                   | d4                |
| 5. $AKT(d \sim p) + MDM2(e \sim U) \rightarrow AKT(d \sim p) + MDM2(e \sim p)$ | k8                |
| 6. $MDM2(e \sim p) \rightarrow MDM2(e \sim U)$                                 | d8                |
| 7. $MDM2(e \sim U) \rightarrow \text{Trash}()$                                 | d7                |
| 8. $MDM2(e \sim p) \rightarrow \text{Trash}()$                                 | d8p               |
| 9. $mdm2t \rightarrow mdm2t + MDM2(e \sim U)$                                  | k7                |
| 10. $mdm2t \rightarrow \text{Trash}()$                                         | d7                |
| 11. $DNAD + MDM2(e \sim p) \rightarrow DNAD$                                   | Hill(dm1,h0,n2)   |
| 12. $P53 \rightarrow P53 + mdm2t$                                              | Hill(k6,Kb,n3)    |
| 13. $I() \rightarrow I() + P53$                                                | k9                |
| 14. $P53 \rightarrow \text{Trash}()$                                           | d9                |
| 15. $MDM2(e \sim p) + P53 \rightarrow MDM2(e \sim p)$                          | d9p               |
| 16. $P53 \rightarrow P53 + PTEN$                                               | Hill(k5,Ka,n3)    |
| 17. $PTEN \rightarrow \text{Trash}()$                                          | d5                |
| 18. $P53 \rightarrow P53 + P21$                                                | Hill(k10,Kc,n2)   |

19.  $P21 \rightarrow \text{Trash}()$ 

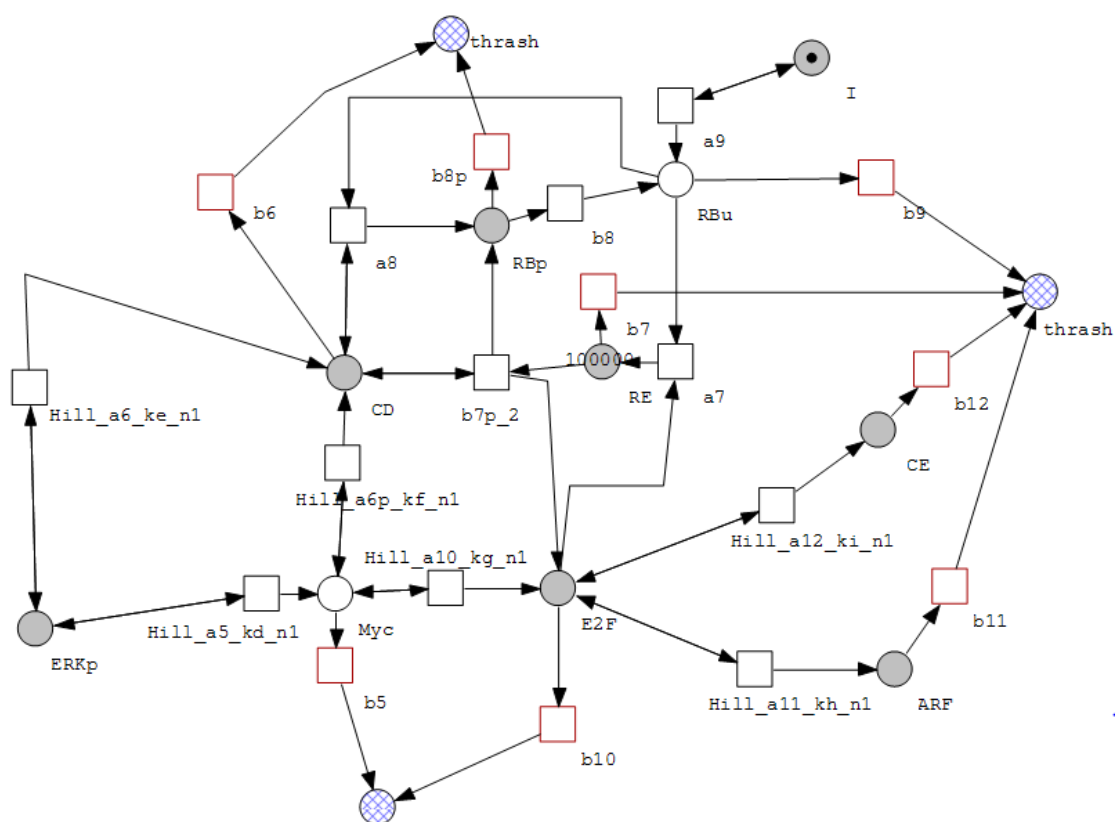
d10

20.  $P53 + \text{DNAD} \rightarrow P53 + \text{DNA}$ 

Hill(g0,v0,n2)

**Πίνακας 5.3.3 :** Κανόνες BioNetGen για το σηματοδοτικό μονοπάτι Rb – E2F

Για τη μοντελοποίηση σε δίκτυο Πέτρι ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία με τα προηγούμενα και παρουσιάζεται στην εικόνα που ακολουθεί.

**Εικόνα 5.3.3 :** Το RB-E2F Μονοπάτι

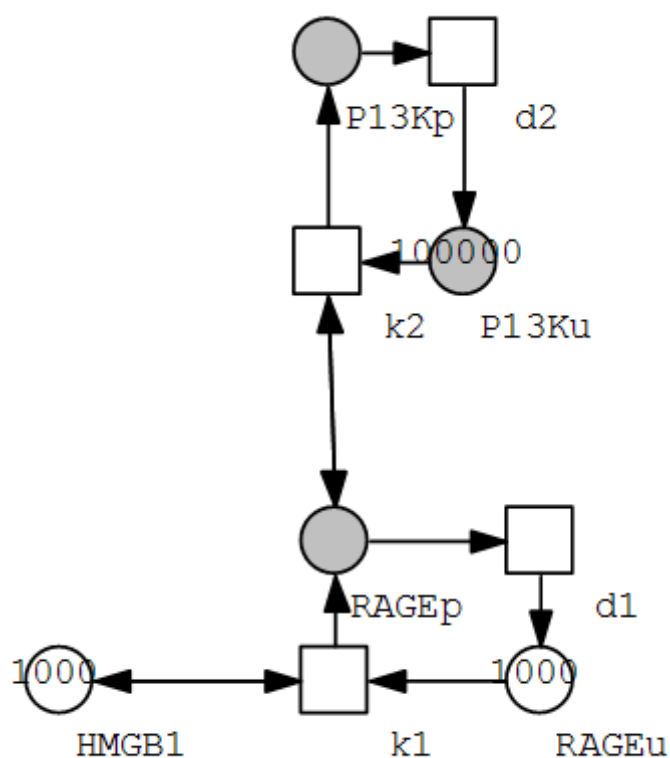
### γ) Βασικές Αντιδράσεις Αρχικοποίησης

Αυτοί οι κανόνες δεν συνιστούν ένα ξεχωριστό μονοπάτι αλλά όπως φαίνεται και στην εικόνα 5.2.1 αποτελούν τα πρώτα σηματοδοτικά βήματα για όλα τα άλλα μονοπάτια. Η πρωτεΐνη HMGB1 βρίσκεται σε αυτό το κομμάτι.

| Κανόνας                                                                          | Ρυθμός Αντίδρασης |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1. $HMGB1 + RAGE(a \sim U) \rightarrow HMGB1 + RAGE(a \sim p)$                   | k1                |
| 2. $RAGE(a \sim p) \rightarrow RAGE(a \sim U)$                                   | d1                |
| 3. $RAGE(a \sim p) + PI3K(b \sim U) \rightarrow RAGE(a \sim p) + PI3K(b \sim p)$ | k2                |
| 4. $PI3K(b \sim p) \rightarrow PI3K(b \sim U)$                                   | d2                |

**Πίνακας 5.3.4 :** Κανόνες για το ERK –RAS μονοπάτι

Ακολουθεί το αντίστοιχο δίκτυο Πέτρι :



**Εικόνα 5.3.4 :** Βασικές Αντιδράσεις Αρχικοποίησης

#### δ) Αντιδράσεις με την INK4A πρωτεΐνης και αντιδράσεις αλληλεπίδρασης

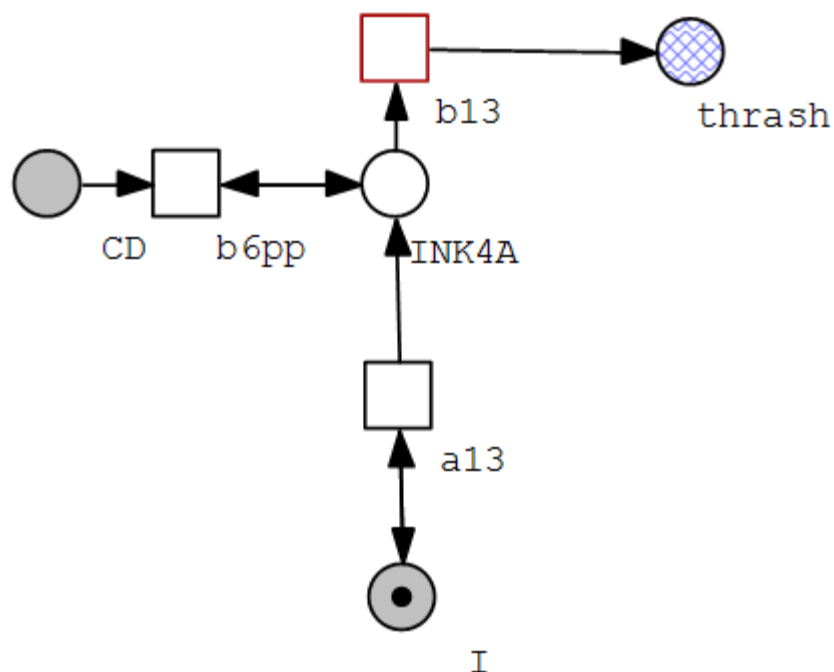
Η πρωτεΐνη INK4A έχει ογκοκατασταλτική δραστηριότητα και οι αντιδράσεις που ακολουθούν είναι μέρος του σηματοδοτικού μονοπατιού Rb-E2F.

Τις παρουσιάζουμε όμως ξεχωριστά ακολουθώντας την τακτική του κώδικα

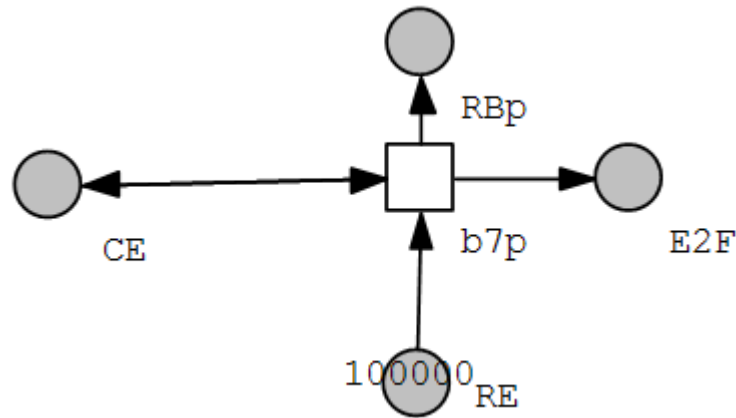
BioNetGen. Επίσης ο τέταρτος κανόνας συσχετίζει τα σηματοδοτικά μονοπάτια p53 και E2F προσομοιώνοντας της αλληλεπιδράσεις που αναφέρθηκαν στην ενότητα 5.2.

| Κανόνας                                                                | Ρυθμός Αντίδρασης |
|------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1. $I() \rightarrow I() + \text{INK4A}$                                | a13               |
| 2. $\text{INK4A} + \text{CD} \rightarrow \text{INK4A}$                 | b6pp              |
| 3. $\text{INK4A} \rightarrow \text{Trash}()$                           | b13               |
| 4. $\text{CE} + \text{RE} \rightarrow \text{CE} + \text{Rb}(j \sim p)$ | b7p               |

**Πίνακας 5.3.5 :** Κανόνες για το ERK –RAS μονοπάτι



**Εικόνα 5.3.5 :** Αντιδράσεις INK4A που ανήκουν στο Rb-E2F μονοπάτι



**Εικόνα 5.3.6 :** Αντιδράσεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των μονοπατιών P53 και Rb

#### 5.4 Υπολογιστικά Αποτελέσματα

Σε αυτή την ενότητα περιγράφονται τα υπολογιστικά πειράματα που έγιναν πάνω στο μοντέλο και τα αποτελέσματα που λήφθηκαν. Στην αρχή έγινε μια βασική προσομοίωση της λειτουργίας του μοντέλου. Για την προσομοίωση αλλά και τα πειράματα που ακολούθησαν ο πίνακας 5.3.1 δίνει τις αρχικές συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες χωρίς αρχική συγκέντρωση παραλείπονται. Για τη διεξαγωγή της προσομοίωσης χρησιμοποιήθηκε ο στοχαστικός προσομοιωτής του Snoopy. Η χρονική διάρκεια της προσομοίωσης ορίσθηκε στα 1500 βήματα που αντιστοιχούν σε 1500 λεπτά, δηλαδή 25 ώρες πραγματικής λειτουργίας του οργανισμού. Στην εικόνα 5.4.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσομοίωσης. Η προσομοίωση πραγματοποιήθηκε πέντε φορές, για μεγαλύτερη ακρίβεια, και τα αποτελέσματα δείχνουν το μέσο όρο των προσομοιώσεων.

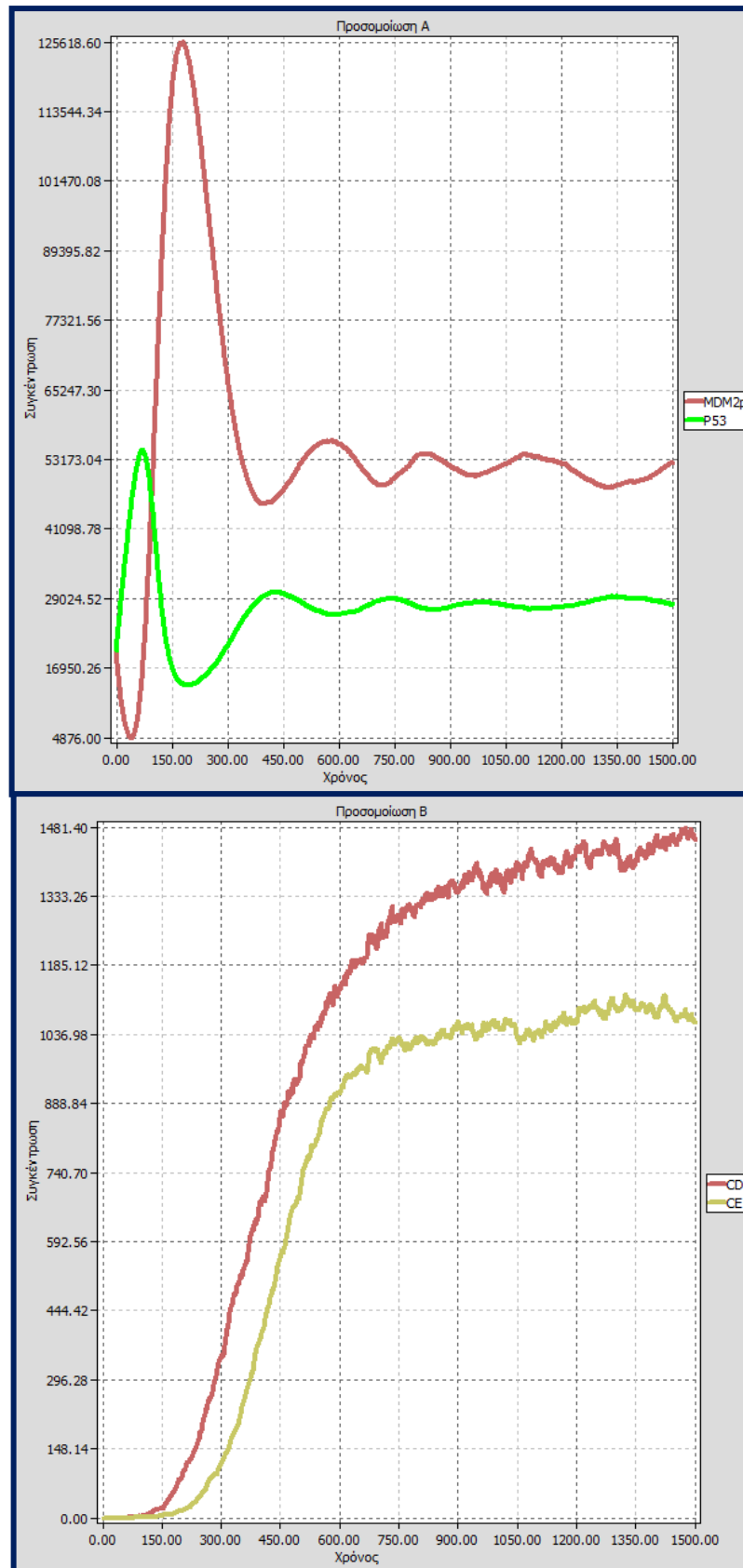
Η προσομοίωση Α της εικόνας 5.4.1 παρουσιάζει τη μεταβολή της συγκέντρωσης των p53 και MDM2 κατά τη διάρκεια του πειράματος. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα επίπεδα έκφρασης της p53 και της MDM2p ταλαντεύονται ακόμη και μετά από τις 10 ώρες τις οποίες χρειάζεται το κύτταρο για να μεταβεί από την G1 στην S φάση. Μεγαλύτερες ταλαντεύσεις μεταξύ των πρωτεϊνών υποδηλώνουν ισχυρότερη αλληλεπίδραση. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με το [34],

ένα πείραμα που έγινε σε εργαστήριο, και στο οποίο παρατηρήθηκε ότι οι p53 και MDM2 σε καρκινικά κύτταρα του μαστού που δέχθηκαν γ ακτινοβολία παρουσίαζαν μεταβολή στις συγκεντρώσεις τους η οποία διήρκησε περισσότερο από 72 ώρες μετά από την ακτινοβολή. Στην εικόνα 5.4.2 φαίνονται η δραστηριότητα των πρωτεϊνών όπως μελετήθηκε στο [34]. Το επίπεδο έκφρασης των πρωτεϊνών p53 και MDM2 μέσα στον πυρήνα του κυττάρου καταγράφηκε με τη μέθοδο φθορισμού. Στο εργαστήριο παρατηρήθηκε ότι τα κύτταρα διαιρούνταν με γοργό ρυθμό για τουλάχιστον τρεις ημέρες.

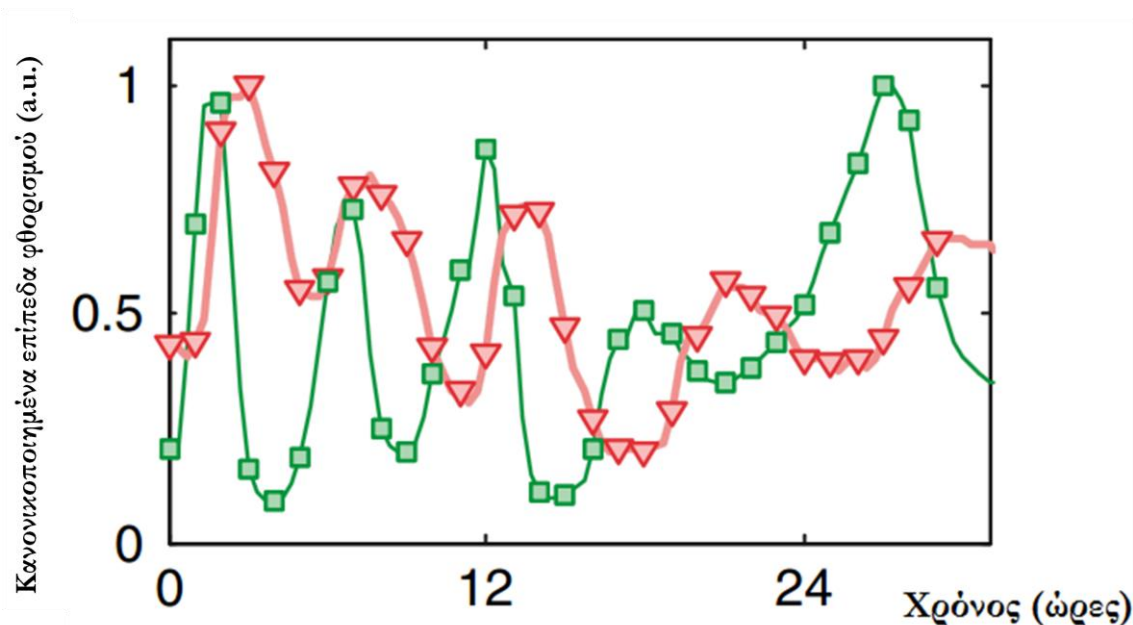
Η προσομοίωση B της αυτής εικόνας, δείχνει τη μεταβολή της συγκέντρωσης των Cyclin D και Cyclin E. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια πρωτεϊνών Cyclin και η λειτουργία τους σχετίζεται με την προώθηση της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης δείχνουν ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών φθάνει τα μέγιστα επίπεδα περίπου στις 10 ώρες προσομοίωσης μετά που το κύτταρο προχωρεί με την αντιγραφή του DNA.

| RAGE   | PI3K   | PIP2   | AKT    | MDM2   | MDM2p          | P53            | RAS    | RAF    | MEK    | ERK    | RE     |
|--------|--------|--------|--------|--------|----------------|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| $10^3$ | $10^5$ | $10^5$ | $10^5$ | $10^4$ | $2 \cdot 10^4$ | $2 \cdot 10^4$ | $10^4$ | $10^4$ | $10^4$ | $10^4$ | $10^5$ |

**Πίνακας 5.4.1** – Η αρχική συγκέντρωση πρωτεϊνών για το πρώτο πείραμα.



**Εικόνα 5.4.1** – Προσομοίωση της λειτουργίας του μοντέλου. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τον στοχαστικό αναλυτή του Snoopy.



**Εικόνα 5.4.2** – Κανονικοποιημένα επίπεδα φθορισμού των p53 (πράσινο) και MDM2 (κόκκινο) μετά από ακτινοβολήση ακτίνων γ

Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος του βαθμού εκφραστικότητας της HMGB1 και άλλων πρωτεϊνών στον καθορισμό της τύχης του κυττάρου διεξήχθη ένα πρώτο πείραμα. Τα αποτελέσματα του πειράματος, που παρουσιάζονται στην εικόνα 5.4.3, επιβεβαιώνουν τις ενδείξεις μελετών ότι η υπερέκφραση της HMGB1 και των υποδοχέων της προάγουν τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και μειώνουν την απόπτωση. Όπως φαίνεται στην εικόνα 5.4.3 αυξήσαμε την ποσότητα της HMGB1 από 0 έως  $10^6$  και παρατηρήσαμε τις συγκεντρώσεις των E2F και p53, πρωτεϊνών κλειδιά για την ερμηνεία της συμπεριφοράς του καρκινικού κυττάρου.

Το πείραμα διεξήχθη με τη βοήθεια του Marcie γιατί σε αντιδιαστολή με το Snopy, υποστηρίζει παραμετροποίηση του μοντέλου και είναι πιο πρακτικό σε περιπτώσεις σαν αυτές όπου θέλαμε να τρέξουμε πολλές φορές το ίδιο πείραμα με διαφορετικό αρχικό μαρκάρισμα. Στο πείραμα αυτό τρέξαμε το Marcie με τον ακόλουθο τρόπο :

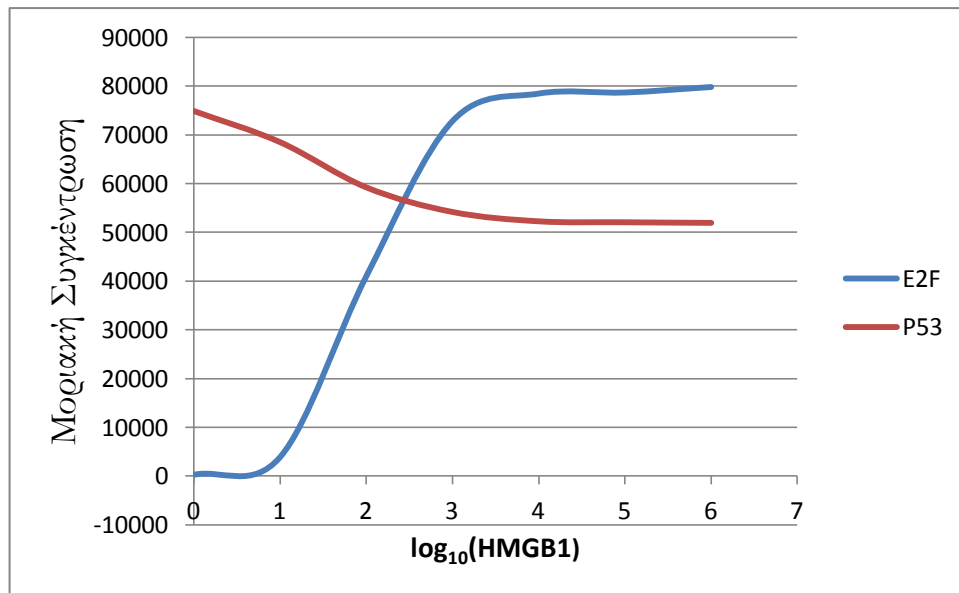
```

marcie
--net-file = HMGB1-MODEL.apnn
--simulative
--sim-stop=600
--sim-runs=5
--threads=4
--sim-out-steps=600
--sim-result-file= results.csv
--const N=100

```

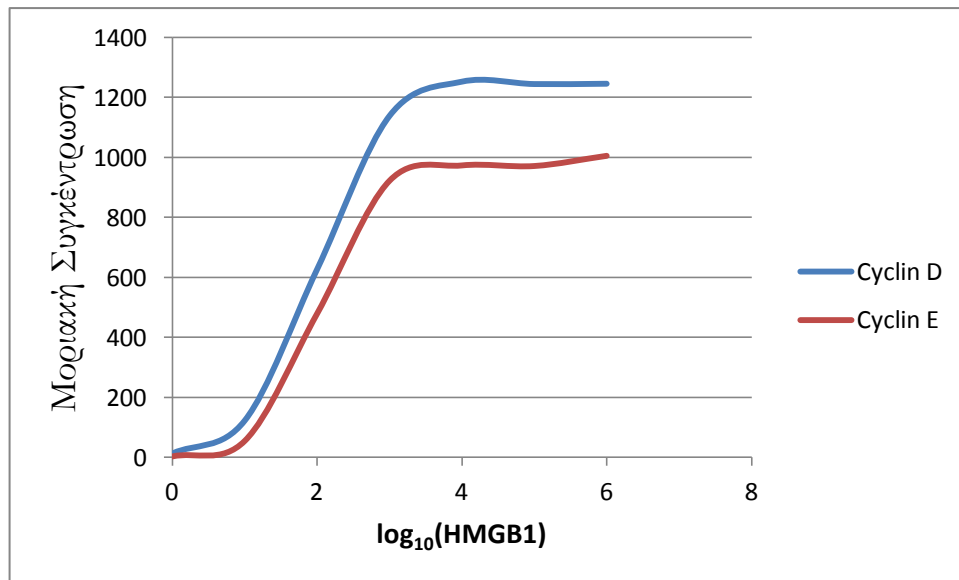
Το `--sim-stop=600` ορίζει το χρόνο προσομοίωσης στα 600 βήματα. Βάση του `--sim-out-steps=600` το μαριάρισμα για κάθε βήμα καταγράφεται στο csv αρχείο. Επίσης το `--const N=100` ορίζει την τιμή της παραμέτρου για κάθε εκτέλεση. Στο πρώτο πείραμα η παράμετρος αφορά τη συγκέντρωση της HMGB1. Όλα τα υπόλοιπα πειράματα έτρεξαν χρησιμοποιώντας παρόμοια κλήση του Marcie.

Το πρώτο πείραμα έτρεξε πέντε φορές για κάθε διαφορετική συγκέντρωση της HMGB1 και τα αποτελέσματα εκφράζουν το μέσο όρο. Το πείραμα έδειξε ότι η δράση της ογκοκατασταλτικής p53 μειώνεται ενόσω η ποσότητα της HMGB1 αυξάνεται. Ωστόσο η δράση της παύει να μειώνεται για τιμές της HMGB1 μεγαλύτερες από  $10^5$ . Τούτο οφείλεται στο γεγονός ότι η HMGB1 μπορεί να ενεργοποιήσει και να αυξήσει τα επίπεδα εκφραστικότητας της E2F της οποίας η υπερέκφραση προκαλεί την ενεργοποίηση της ογκοκατασταλτικής ARF. Η ARF μπορεί να καταστείλει τη δραστηριότητα της MDM2 με σκοπό τη σταθεροποίηση της p53. Επιπρόσθετα έχει βρεθεί ότι η ARF είναι μεταλλαγμένη στο 80% των καρκίνων του πάγκρεας. Μια μεταλλαγμένη πρωτεΐνη δεν μπορεί να λειτουργήσει σωστά και έτσι στην πραγματικότητα η p53 μπορεί να φθάσει σε ακόμη χαμηλότερα επίπεδα.



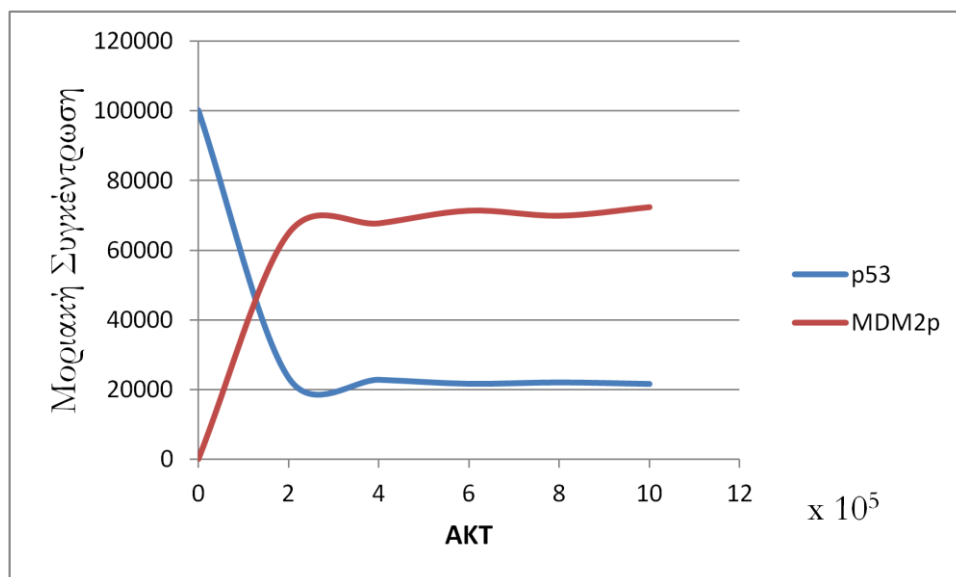
**Εικόνα 5.4.3** – Συμπεριφορά των E2F και P53 κατά την μεταβολή της συγκέντρωσης της HMGB1

Χρησιμοποιώντας τα ίδια πειραματικά δεδομένα καταγράψαμε τη συμπεριφορά των κυκλίνων Cyclin E και Cyclin D ενόσω μεταβάλλεται η συγκέντρωση της HMGB1. Στην εικόνα 5.4.4 φαίνεται ότι η συγκέντρωση των κυκλίνων αυξάνεται μαζί με την αύξηση της HMGB1. Τα πειραματικά αποτελέσματα των δυο τελευταίων γραφικών παραστάσεων δικαιολογούν τις εργαστηριακές ανακαλύψεις, ότι δηλαδή η υπερέκφραση της πρωτεΐνης HMGB1 μειώνει την αποπτωτική ικανότητα των κυττάρων και προάγει την αντιγραφή του γενετικού υλικού και τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων.



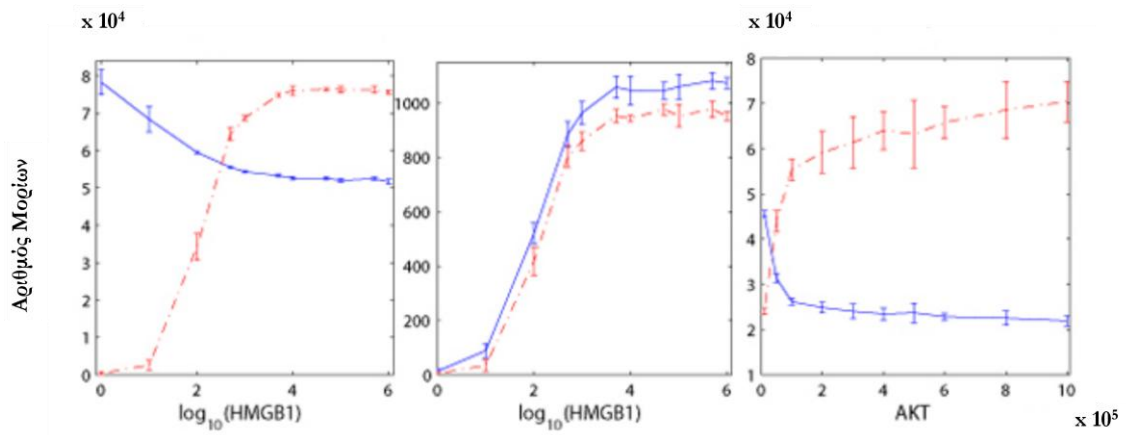
**Εικόνα 5.4.4** – Συμπεριφορά των Cyclin D και Cyclin E κατά την μεταβολή της συγκέντρωσης της HMGB1

Σύμφωνα με μελέτες η ογκοπρωτεΐνη AKT βρίσκεται σε πολύ ψηλά επίπεδα συγκέντρωσης σε πολλούς καρκίνους. Το γεγονός αυτό μας οδήγησε στη διεξαγωγή ενός δεύτερου πειράματος όπου το αρχικό μαρκάρισμα του δικτύου παραμένει σταθερό πλην της θέσης AKTu. Εκτελούμε και πάλι στοχαστική προσομοίωση μέσω του Marcie για 600 βήματα, δηλαδή για 10 ώρες πραγματικής λειτουργίας. Στη εικόνα 5.4.5 καταγράφεται η συμπεριφορά των πρωτεϊνών κλειδιά p53 και MDM2p. Παρατηρούμε ότι η ποσότητα της ογκοκατασταλτικής p53 μειώνεται δραστηνά.



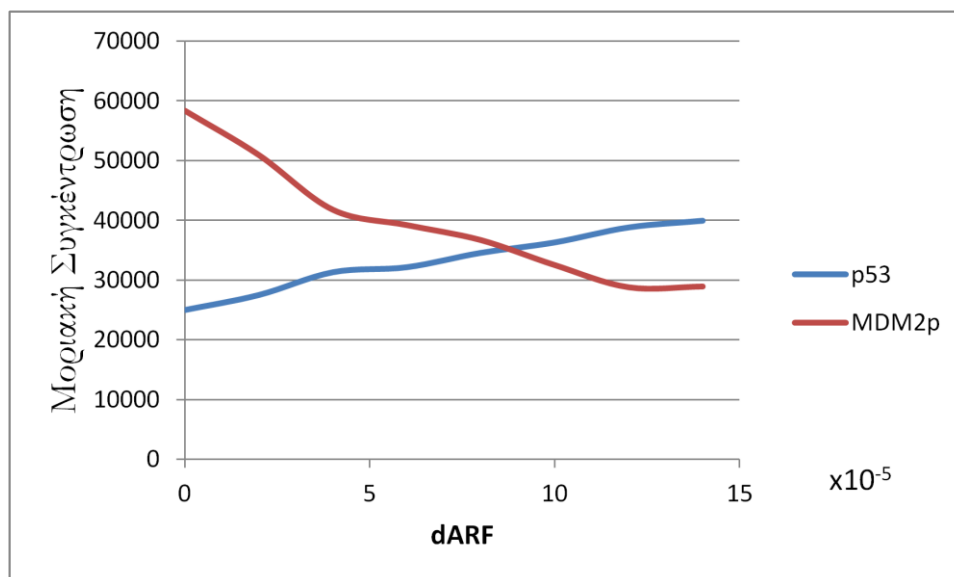
**Εικόνα 5.4.5** – Συμπεριφορά των p53 και MDM2p κατά την μεταβολή της συγκέντρωσης της AKT

Στην εικόνα 5.4.6 παρατίθενται για σκοπούς σύγκρισης τα αποτελέσματα των δυο πειραμάτων από το [2]. Στο συγκεκριμένο άρθρο χρησιμοποιείται ένας άλλος τύπος τυπικής μεθόδου για τη μοντελοποίηση του ίδιου βιολογικού συστήματος. Όσον αφορά το πρώτο πείραμα τα αποτελέσματα είναι κοινά παρόλο που στην εικόνα 5.4.4 η Cyclin D φαίνεται να φθάνει σε υψηλότερα επίπεδα. Επίσης στο δεύτερο πείραμα υπάρχει μια διαφοροποίηση για μικρές τιμές της AKT. Οι διαφορές οφείλονται αφενός στο γεγονός ότι η στοχαστική προσομοίωση παράγει αποτελέσματα που έχουν μεταξύ τους μικρή διαφορά και αφετέρου στο ότι δεν είχαμε τις πλήρεις πληροφορίες σχετικά με τη ρύθμιση του μοντέλου που έγινε στα άρθρα για σκοπούς προσομοίωσης. Πάντως τα αποτελέσματα σε γενικές γραμμές είναι λογικά και αναμενόμενα.



**Εικόνα 5.4.6** – Τα αποτελέσματα των δύο πρώτων πειραμάτων από το άρθρο των Haijun Gong et al.

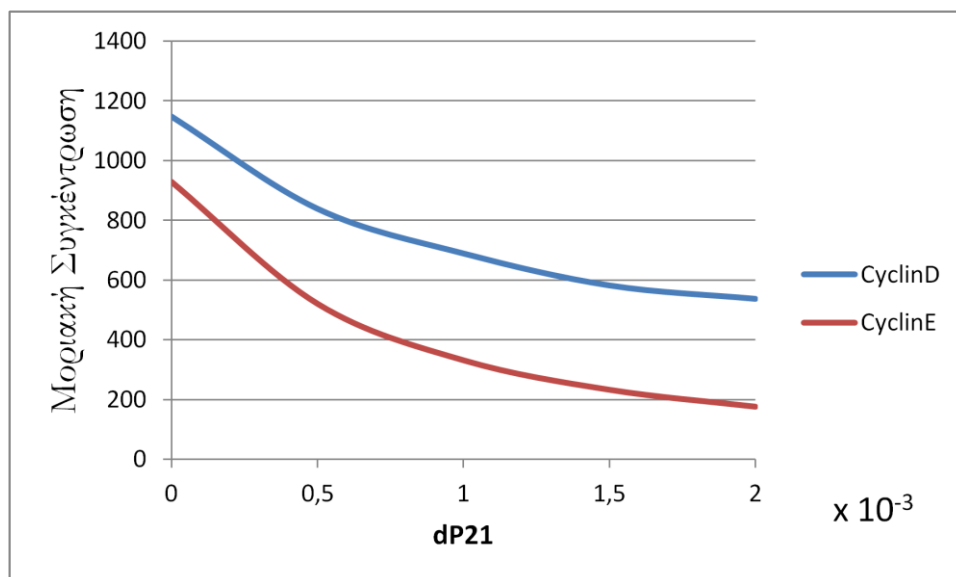
Στη συνέχεια ακολουθούν πειράματα που ασχολούνται με τις μεταβολές του κυτταρικού κύκλου στην παρουσία μεταλλάξεων. Το τρίτο κατά σειρά πείραμα ασχολείται με την ARF πρωτεΐνη η οποία είναι ικανή στο να επαναφέρει το κύτταρο που έχει υποστεί ογκογονική βλάβη. Αυτό το επιτυγχάνει με τη δέσμευση της με την MDM2 καταστέλλοντας έτσι τη λειτουργία της. Η προσομοίωση της μετάλλαξης επιτυγχάνεται με τη μεταβολή του ρυθμού αντίδρασης καταστολής της MDM2 από την ARF. Η μετάλλαξη επηρεάζει το ρυθμό δράσης μιας πρωτεΐνης. Ο ρυθμός καταστολής στο μοντέλο αφορά την παράμετρο d7p. Τρέξαμε το μοντέλο για διαφορετικές τιμές του ρυθμού αντίδρασης d7p και παρατηρήσαμε τη συμπεριφορά των πρωτεϊνών p53 και MDM2. Τα αποτελέσματα φαίνονται στην εικόνα 5.4.7. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 5 φορές για μεγαλύτερη ακρίβεια. Η χρονική διάρκεια κάθε πειράματος ήταν 600 βήματα ( 10 ώρες ) και καταγράφηκαν οι τελικές συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών (στις 10 ώρες). Μεγάλες τιμές dARF ( ρυθμός d7p ) αντιστοιχούν σε μικρή μετάλλαξη ενώ μικρές τιμές αντιστοιχούν σε μεγάλη μετάλλαξη.



**Εικόνα 5.4.7 :** Η μετάλλαξη της ARF υποστέλλει την ογκοκατασταλτική της επίδραση της έναντι της MDM2.

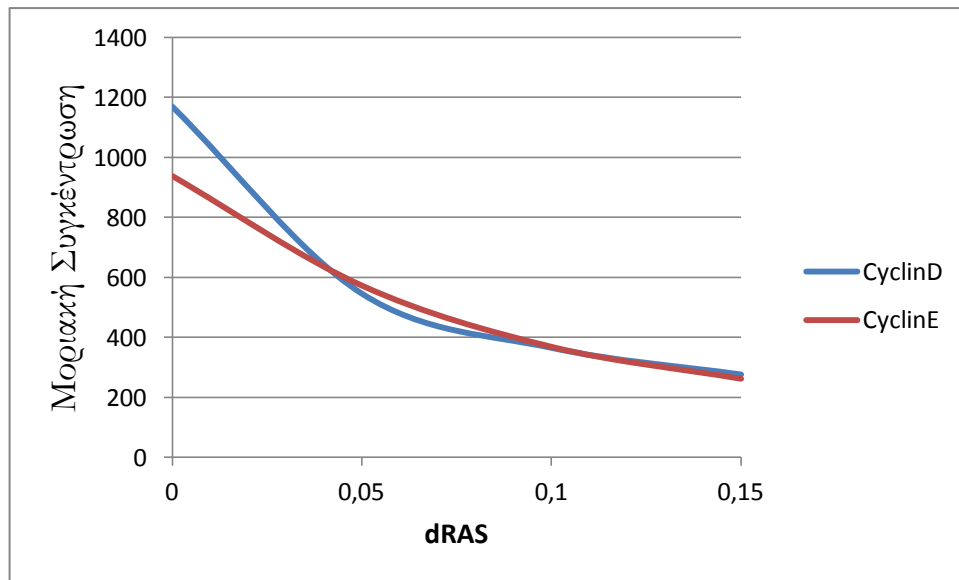
Τα αποτελέσματα που φαίνονται στη γραφική παράσταση δείχνουν ότι η ARF στη φυσιολογική της μορφή μπορεί να ελαχιστοποιήσει τον αριθμό των φωσφορυλιωμένων MDM2 μορίων και να προάγει την αύξηση της p53 οδηγώντας στην απόπτωση.

Το τέταρτο πείραμα ασχολήθηκε με τις p21 και FBXW7 πρωτεΐνες, πρωτεΐνες που βρίσκονται συχνά μεταλλαγμένες σε πολλούς καρκίνους. Αμφότερες οι πρωτεΐνες αναπαριστώνται με τη θέση της p21 λόγω έλλειψης ποσοτικών βιολογικών στοιχείων. Και οι δυο πρωτεΐνες μπορούν να καταστείλουν τη λειτουργία των κυκλίνων CyclinD και Cyclin E εμποδίζοντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Στο μοντέλο η p21 καταστέλλει τις Cyclin D και Cyclin E με ρυθμό b6p και b12p αντίστοιχα. Εφαρμόσαμε λοιπόν την ίδια διαδικασία με το προηγούμενο πείραμα μόνο που αυτή τη φορά μεταβάλαμε τις παραμέτρους b6p και b12p. Στην εικόνα 5.4.8 καταγράφονται σε γραφική παράσταση τα αποτελέσματα του πειράματος και σύμφωνα με αυτά η συγκέντρωση των κυκλίνων Cyclin E και Cyclin D θα αυξηθεί εάν η p21 υποστεί μετάλλαξη ( μικρές τιμές dP21 ).



**Εικόνα 5.4.8 :** Η μετάλλαξη της p21 επιτρέπει την αύξηση των συγκεντρώσεων στις κυτλίνες CyclinD και CyclinE.

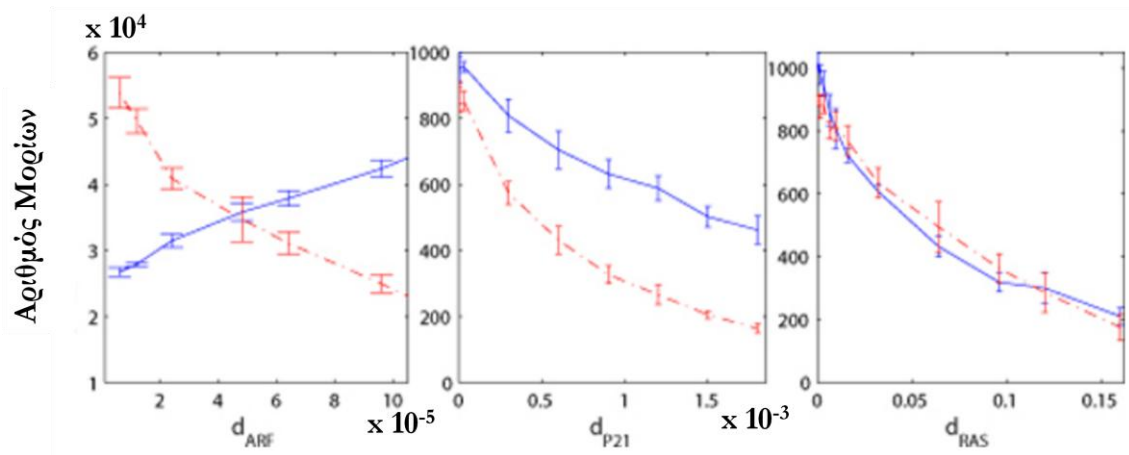
Το πέμπτο και τελευταίο πείραμα ασχολήθηκε με τη μελέτης της μετάλλ-  
 λαξης της πρωτεΐνης RAS. Όπως αναφέρθηκε, η ARF βρέθηκε να είναι μεταλ-  
 λαγμένη στο 80% των καρκίνων στο πάγκρεας. Τα ίδια αποτελέσματα [2] βρέ-  
 θηκαν και για την K-RAS πρωτεΐνη, μια πρωτεΐνη της οικογένειας RAS. Έχει  
 βρεθεί ότι η πρωτεΐνη αυτή απενεργοποιείται από κάποιες πρωτεΐνες κινάσες και  
 επιπλέον ότι σε μεταλλαγμένη μορφή δεν μπορεί να απενεργοποιηθεί ακόμα και  
 αν η HMGB1, που προκαλεί την αρχική ενεργοποίηση της, σταματήσει να την  
 ενεργοποιεί. Αυτό συνεπάγεται τη συνεχή διέγερση του μονοπατιού της με απο-  
 τέλεσμα τον αδιάκοπο κυτταρικό πολλαπλασιασμό.



**Εικόνα 5.4.9 :** Η μετάλλαξη του RAS μειώνει το ρυθμό αυτοκαταστολής του με αποτέλεσμα την προώθηση πολλαπλασιασμού των CyclinD και CyclinE

Τρέξαμε το πείραμα για διαφορετικές τιμές του ρυθμού αντίδρασης b1 που αντιστοιχεί στο ρυθμό αποφωσφορυλίωσης της RAS. Η εικόνα 5.4.9 δείχνει ότι η αύξηση της καταστολής της RAS προκαλείται μείωση στην παραγωγή των κυκλίνων. Από την άλλη μικρή καταστολή προκαλεί υπερέκφραση των κυκλίνων.

Στην εικόνα 5.4.10 δίδονται για αντιπαράβολή τα ευρήματα των τριών περιγραμάτων μετάλλαξης από το [2]. Για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν και προηγουμένως τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζουν μια μικρή απόκλιση από το άρθρο. Ωστόσο η γενική συμπεριφορά είναι η ίδια και κινείται σε αναμενόμενα επίπεδα.



**Εικόνα 5.4.10 :** Τα αποτελέσματα των υπολογιστικών πειραμάτων μετάλλαξης από το άρθρο των Haijun Gong et al.

## 5.5 Επικύρωση του Μοντέλου

Για την επικύρωση της ορθότητας του μοντέλου, ως προς το πρωτότυπο σύστημα, χρησιμοποιήθηκε μοντελοέλεγχος με τη χρήση της Πιθανολογικής Γραμμικής Χρονικής Λογικής PLTL (ενότητα 4.4). Θεωρούμε μια ιδιότητα αληθής όταν η πιθανότητα ικανοποίησης της ιδιότητας είναι τουλάχιστον 90%.

Ο μοντελοέλεγχος έγινε με τη βοήθεια του Marcie (ενότητα 3.7.4) το οποίο υποστηρίζει τη λογική PLTL. Υπάρχουν τρεις τρόποι με τους οποίους μπορούμε να εφαρμόσουμε μοντελοέλεγχο στο Marcie. Ο ένας είναι να εισάγουμε την ιδιότητα κάνοντας χρήση του τελεστή  $P = ?$ , έτσι ώστε να μας επιστραφεί η πιθανότητα αληθείας. Ένας άλλος τρόπος είναι να χρησιμοποιήσουμε τον τελεστή  $P \geq 0,9$  όπου μας επιστρέφει την τιμή 1 (αληθές) εάν η ιδιότητα ικανοποιείται στο 90% των μονοπατιών προσομοίωσης και 0 (ψευδής) στην αντίθετη περίπτωση. Σε αυτές τις περιπτώσεις μπορούμε είτε να ορίσουμε τον ακριβή αριθμό προσομοιώσεων είτε το διάστημα εμπιστοσύνης και την εκτιμώμενη ακρίβεια του αποτελέσματος. Ωστόσο, για να βρούμε με ακρίβεια πόσα μονοπάτια επικυρώνουν την ιδιότητα, καθώς αυτή η πληροφορία χάνεται, εφαρμόσαμε μια άλλη μέθοδο τρέχοντας το Marcie μέσω ενός απλού script το οποίο καλούσε

το εργαλείο να επικυρώσει το μοντέλο κάνοντας μια μόνο προσομοίωση και κάθε φορά αποθηκεύαμε το αποτέλεσμα.

Οι κανόνες σύνταξης PLTL για το Marcie βρίσκονται στον οδηγό χρήσης που βρίσκεται στην ιστοσελίδα του εργαλείου. Για κάθε ιδιότητα που βρίσκεται στο αρχείο property.pltl καλούμε το Marcie ως εξής :

```
marcie
--net-file = HMGB1-MODEL.apnn
--ltl-file = property.pltl
--simulative
--threads = 4
--sim-runs = 1
>> output.txt
```

Ακολουθούν ορισμένες επιθυμητές ιδιότητες που πρέπει να πληροί το μοντέλο από το [2] σύμφωνα με τους κανόνες σύνταξης PLTL στο Marcie :

**Ιδιότητα 1 :** Το επίπεδο εκφραστικότητας της p53 αυξάνεται ραγδαία ως ανταπόκριση των διάφορων ερεθισμών που δέχεται συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης από την HMGB1. Η ιδιότητα PLTL είναι :

$$P \geq 0.9 [ F[0,100] [P53 > 53000] ]$$

Η ιδιότητα κάνει χρήση του χρονικού περιορισμού για τον τελεστή F. Συγκεκριμένα λέει ότι εντός 100 βημάτων, η ποσότητα της p53 θα ξεπεράσει τελικά τα 53000 μόρια. Εφαρμόσαμε μοντελοέλεγχο σε 38 μονοπάτια και η ιδιότητα ήταν αληθής σε όλα ( 100% αληθής ). Το πείραμα διήρκεσε 75 δευτερόλεπτα.

**Ιδιότητα 2 :** Η πρωτεΐνη PI3K θα ενεργοποιηθεί εντός ολίγων λεπτών αφού η HMGB1 ενωθεί με την RAGE. Η PLTL ιδιότητα είναι :

$$P \geq 0.9 [ F[0,20] [ PI3K_p / (PI3K_p + PI3K_u) > 0.5 ] ]$$

Η ιδιότητα λέει ότι η μισή ποσότητα της PI3K θα ενεργοποιηθεί εντός είκοσι λεπτών. Το πείραμα επαναλήφθηκε για διαφορετικές τιμές της HMGB1 και τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Όταν η HMGB1 είχε υψηλή συγκέντρωση η ιδιότητα ήταν αληθής. Από την άλλη η ιδιότητα δεν ήταν αληθής ( ποσοστό επιτυχίας μικρότερο από 90% ) όταν η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν σχετικά λιγότερη.

| HMGB1           | Αρ. Δειγμάτων | Αληθές Δείγματα | Αποτέλεσμα | Χρόνος (s) |
|-----------------|---------------|-----------------|------------|------------|
| $10^3$          | 9             | 0               | Ψευδής     | 4          |
| $9 \times 10^3$ | 380           | 328             | Ψευδής     | 237,5      |
| $10^5$          | 22            | 22              | Αληθής     | 13         |

**Πίνακας 5.5.1 :** Η υπερέκφραση της HMGB1 προκαλεί την γρήγορη ενεργοποίηση της PI3K.

**Ιδιότητα 3 :** Εντός 300 λεπτών ( βημάτων ), το επίπεδο έκφρασης της κυκλίνης CyclinE πέφτει πολύ χαμηλά έως ότου το 50% της RAS ενεργοποιηθεί από την HMGB1. Η ιδιότητα είναι :

$$P \geq 0.9 \left[ [CE < 10] \cup [0, 300] \left[ (RASp / (RASp + RASu)) > 0.5 \right] \right]$$

και σημαίνει ότι η CyclinE (CE) θα έχει συγκέντρωση λιγότερη από 10 μόρια μέχρι τουλάχιστον η μισή ποσότητα της RAS να βρίσκεται σε ενεργοποιημένη κατάσταση. Εξετάσαμε 22 μονοπάτια και όλα αποδέχτηκαν την ιδιότητα. Ο χρόνος προσομοίωσης ήταν 91 δευτερόλεπτα.

Οι ιδιότητες που αναφέρονται εδώ δεν είναι εξαντλητικές αλλά πλήθος άλλων ιδιοτήτων θα μπορούσαν να συνταθούν για την επικύρωση του μοντέλου. Εξετάστηκαν κάποιες βασικές ιδιότητες ως παράδειγμα. Στην πραγματικότητα όμως ο μοντελοέλεγχος, όσες ιδιότητες και αν ελεγχθούν, δεν παρέχει πλήρη πιστοποίηση του μοντέλου. Εντούτοις αυξάνει την εμπιστοσύνη που έχουμε έναντι σε αυτό. Όπως φαίνεται και στις παραπάνω ιδιότητες, είναι μια εύκολη αυτοματοποιημένη διαδικασία που μπορεί γενικά να διεκπεραιωθεί σε σύντομο

χρόνο. Ωστόσο σε περιπτώσεις σαν αυτές όπου ο μοντελοέλεγχος γίνεται κατά την προσομοίωση ο χρόνος ανταπόκρισης μπορεί να είναι αποτρεπτικός εάν αποζητούμε μεγάλη ακρίβεια στα αποτελέσματα μας ή εάν η ιδιότητα καλύπτει ένα μακρύ χρονικό διάστημα.

Σίγουρα, στο χώρο της μοντελοποίησης βιολογικών συστημάτων, ο μοντελοέλεγχος μπορεί να δώσει συγκεκριμένες απαντήσεις για ένα βιολογικό σύστημα επιταχύνοντας την ερευνητική διαδικασία. Ως γνωστόν, η πειραματική διαδικασία του εργαστηρίου είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα. Οι πειραματικοί βιολόγοι έχουν λοιπόν, δια μέσου του μοντελοελέγχου, ένα σύστημα ερωταποκρίσεων, σαν μια βάση δεδομένων, όπου παίρνουν γρήγορες απαντήσεις σε συγκεκριμένα ερωτήματα που θέτουν για το βιολογικό σύστημα. Αυτό το κεφάλαιο ήταν σε γενικές γραμμές μια απόδειξη αυτών που ειπώθηκαν από την αρχή της μελέτης ότι δηλαδή η υπολογιστική σκέψη μπορεί να συμβάλει αποδοτικά στον επαναπροσδιορισμό της βιολογικής έρευνας.

# Κεφάλαιο 6

## Συμπεράσματα

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| 6.1 Γενικά Συμπεράσματα | 98  |
| 6.2 Τελική Ανασκόπηση   | 99  |
| 6.3 Μελλοντική Έρευνα   | 100 |

### 6.1 Γενικά Συμπεράσματα

Το σύστημα ρύθμισης της κυτταρικής ισορροπίας πολλαπλασιασμός-θάνατος είναι πολύ περίπλοκο και ο βαθμός που οι επιστήμονες τον έχουν κατανοήσει είναι μικρός. Τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται σε αυτή τη ρυθμιστική διαδικασία έχουν σύνθετες αλληλεπιδράσεις και χρειάζονται περαιτέρω έρευνα. Οι υπολογιστικές μέθοδοι είναι σύμμαχος αυτής της προσπάθειας μια γεύση της οποίας πήραμε σε αυτή τη μελέτη.

Τα Δίκτυα Πέτρι φάνηκαν πολύ εύχρηστα στη μοντελοποίηση των σηματοδοτικών μονοπατιών και το μοντέλο που παρήχθηκε ανταποκρίθηκε πολύ ικανοποιητικά στις ερευνητικές ανακαλύψεις των βιοχημικών εργαστηρίων. Η στοχαστική επέκταση παρέχει μια σημασιολογία που προσεγγίζει τη συμπεριφορά των βιολογικών συστημάτων. Οι τεχνική μοντελοελέγχου με χρονικές λογικές επικύρωσε την ορθότητα του μοντέλου ως προς τις απαιτήσεις του βιολογικού συστήματος.

Η γραφική αναπαράσταση των δικτύων Πέτρι παρέχει πλεονεκτήματα έναντι άλλων μη-γραφικών τυπικών μεθόδων. Βλέποντας ένα δίκτυο σηματοδοτικού μονοπατιού αμέσως γίνονται αντιληπτές οι οντότητες και οι συσχετίσεις που έχουν μεταξύ τους. Ένας πειραματικός βιολόγος θα προτιμούσε ασφαλώς μια τέτοια γραφική αναπαράσταση. Η δυνατότητα επιπλέον να οριστεί ένα δίκτυο και υπό τη μορφή κώδικα ικανοποιεί αυτούς που θέλουν να αποφύγουν την γραφική

απεικόνιση. Το Snoopy, όπως αναφέρθηκε στη σχετική ενότητα, μπορεί να εξαγάγει το μοντέλο αυτομάτως σε διαφορετικές μορφές.

Όσον αφορά τις πειραματικές προσομοιώσεις, αυτές ολοκληρώθηκαν σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα στον υπολογιστή. Συνεπώς ο ερευνητής βιολόγος μπορεί να κερδίσει χρόνο και χρήμα εάν εκμεταλλευτεί τη δυνατότητα που του προσφέρει η τυπική ανάλυση. Ένα πείραμα που χρειάστηκε περίπου ένα λεπτό στο Marcie για να ολοκληρωθεί χρειάζεται 25 ώρες στο εργαστήριο. Η απλή σημασιολογία των Δικτύων Πέτρι, που βρίσκεται σε άμεση αντιστοιχία με την υπολογιστική υλοποίηση, επιτρέπει την αποδοτική και γρήγορη υπολογιστική επεξεργασία. Παρά ταύτα, ορισμένοι περιορισμοί ενδεχομένως να προκύψουν κατά τη διαδικασία μοντελοποίησης. Όπως αναφέρθηκε, η δυσκολία ανάλυσης ενός μη οριοθετημένου μοντέλου είναι αυξημένη. Ακόμη και τα δίκτυα με πολύ ψηλή οριοθέτηση καθιστούν πολύ αργή την ανάλυση αν και οι υπολογιστικές δυνατότητες στην εποχή μας αυξάνονται προσδίδοντας μεγαλύτερες ταχύτητες επεξεργασίας. Φυσικά, πάντοτε υπάρχει η δυνατότητα να οριστεί ένα μοντέλο περισσότερο αφαιρετικά και δια της ποιοτικής ανάλυσης να εξαχθούν και πάλι χρήσιμα συμπεράσματα.

Το σηματοδοτικά μονοπάτια που βρίσκονται καθοδικά της HMGB1 φαίνεται πως πράγματι έχουν σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της τύχης του κυττάρου. Υπερέκφραση της HMGB1 επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διέγερση μονοπατιών που προωθούν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Τα πειραματικά αποτελέσματα στο Marcie επιβεβαίωσαν αυτόν τον ισχυρισμό καθώς έδειξαν ότι η αύξηση της HMGB1 προωθούσε το κύτταρο να αναπτυχθεί και να πολλαπλασιαστεί πρόωρα. Επιπλέον, τα πειράματα μετάλλαξης επιβεβαίωσαν τον γεγονόσ ότι η αντικαρκινική δραστηριότητα ορισμένων ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών είναι ιδιαίτερα περιορισμένη όταν αυτές υποστούν μετάλλαξη ή καταστολή.

## 6.2 Τελική Ανασκόπηση

Η διαδικασία ανάπτυξης ενός βιολογικού μοντέλου ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα. Μέσα από αυτή μπόρεσα να αξιοποιήσω τις γνώσεις μου από τον χώρο της πληροφορικής και να τις εφαρμόσω σε ένα βιολογικό πρόβλημα. Έτσι όλη αυτή η πορεία ανάπτυξης με βοήθησε να αντιληφθώ καλύτερα τη συνεισφορά που μπορεί να έχει η πληροφορική στα προβλήματα που απασχολούν την ανθρωπότητα όπως ο καρκίνος στην προκειμένη περίπτωση.

Ασφαλώς συνάντησα αρκετές δυσκολίες σε αυτή τη διαδικασία ιδιαίτερα στην αρχή. Έπρεπε να αφιερώσω κάποιο χρόνο αρχικά για να εξοικειωθώ με κάποιες βασικές έννοιες που αφορούσαν το βιολογικό σύστημα. Επίσης κατά την ανάπτυξη του μοντέλου υπήρξαν κάποιες δυσκολίες καθώς τα πειραματικά αποτελέσματα απέκλιναν αρκετά από τα αναμενόμενα κάτι το οποίο ξεπεράστηκε με τη διόρθωση του μοντέλου. Είχα επιπλέον αντιμετωπίσει κάποια προβλήματα με τη χρήση των Snoopy και Marcie με αποτέλεσμα να καθυστερήσει η λήψη αποτελεσμάτων από αυτά. Τα εργαλεία αυτά βρίσκονται στις αρχικές εκδόσεις τους και ενδεχομένως να έχουν κάποια σφάλματα. Ωστόσο οι ομάδες ανάπτυξης των εργαλείων φάνηκαν πολύ πρόθυμες να με βοηθήσουν. Κάποιες μικρές αποκλίσεις παρέμειναν όπως έχει αναφερθεί στο προηγούμενο κεφάλαιο οι οποίες ωστόσο είναι φυσιολογικές. Τελειώνοντας την εργασία, νοιώθω περισσότερο εξοικειωμένος με τα στοχαστικά δίκτυα Πέτρι αν και προκειμένου να θεωρηθεί ότι κάποιος τα καταλαβαίνει σε βάθος θα πρέπει να κατανοήσει τη στοχαστική θεωρία πίσω από αυτά καθώς και τους σχετικούς αλγόριθμους προσομοίωσης.

## 6.2 Μελλοντική Έρευνα

Τα σηματοδικά μονοπάτια του κυττάρου είναι πολυάριθμα και διαρκώς νέα δεδομένα ανακαλύπτονται. Υπάρχουν συνεπώς πολλές προοπτικές έρευνες στο χώρο. Το βιολογικό μοντέλο της έρευνας εξέτασε ένα πολύ μικρό υποσύνολο

λο αυτών των μονοπατιών. Το μοντέλο μπορεί να επεκταθεί και να συμπεριλάβει και άλλα μονοπάτια που έχουν σχετίζονται με τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου. Ήδη το [30] επεκτείνει το παρόν μοντέλο προσθέτοντας το σηματοδοτικό μονοπάτι NFkB. Η NFkB είναι ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών που ρυθμίζουν τη μεταγραφή του γενετικού υλικού.

Πέραν από την επέκταση του μοντέλου μπορούν να γίνουν έρευνες που αφορούν αυτές καθαυτές τις τυπικές μεθόδους. Οι επεκτάσεις των Δικτύων Πέτρι σχεδιάστηκαν για μοντελοποίηση μιας ευρείας κλάσης συστημάτων. Μια επέκταση σχεδιασμένη ειδικά στις ανάγκες των βιολογικών συστημάτων είναι σίγουρα περισσότερο επιθυμητή. Ίσως ο συνδυασμός των προτερημάτων των διαφόρων επεκτάσεων να αποτελέσει μια καλή αρχή. Πάντως η βιβλιογραφία φαίνεται υποσχόμενη στην προώθηση της έρευνας μέσω των τυπικών μεθόδων και οι ωφέλειες που θα προκύψουν στην έρευνα σίγουρα θα είναι πολλαπλές.

# Βιβλιογραφία

- [1] Κ. Σέκερης, «Μηχανισμοί Ογκογένεσης,» *Κοινωνία & Υγεία*, τόμ. ΙΙ, pp. 17-30.
- [2] H. Gong, P. Zuliani, A. Komuralli, J. R. Faeder and E. M. Clarke, "Analysis and Verification of the HMGB1 signaling pathway," in *BMC Bioinformatics*, Tokyo, Japan, 2010.
- [3] F. Fages and S. Soliman, "From Reaction Models to Influence Graphs and Back: A Theorem," in *Formal Methods in Systems Biology*, vol. 5054, Heidelberg, Springer Berlin, 2008, pp. 90-102.
- [4] N. M. Luscombe, D. Greenbaum and M. Gerstein, "What is Bioinformatics? A proposed Definition and Overview of the Field," *Method Inform Med*, vol. 4, pp. 346-358, 2001.
- [5] B. I. S. & T. Initiative, "NIH Working Definition of Bioinformatics And Computational Biology," 17 July 2000. [Online]. Available: <http://www.bisti.nih.gov/docs/CompuBioDef.pdf>. [Accessed 14 May 2012].
- [6] A. L. Vladimir, J. M. Malcolm, L. Trevor and B. Antony, "Systems Biology: The Next Frontier for Bioinformatics," *Advances in Bioinformatics*, vol. 10, no. 1155, 2010.
- [7] E. M. Clarke and J. M. Wing, "Formal Methods: State of the Art and Future Directions," *ACM Computing Surveys*, vol. 28, no. 4, pp. 626-643, 1996.
- [8] J. Fisher and T. A. Henzinger, "Executable Cell Biology," *Nature Biotechnology*, vol. 25, no. 11, pp. 1239-1249, 2007.
- [9] S. A. Kauffman, "Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets," *Theoretical Biology*, vol. 22, no. 3, pp. 437-467, 1969.
- [10] C. A. Petri and W. Reisig, "Scholarpedia," 17 April 2008. [Online]. Available: [http://www.scholarpedia.org/article/Petri\\_net](http://www.scholarpedia.org/article/Petri_net). [Accessed September 2012].
- [11] C. Petri, *Intepretations of Net Theory*, 2 ed., Bonn: Society for Mathematics and Computer Science, 1976.
- [12] I. Koch, W. Reisig and F. Schreiber, *Modeling in Systems Biology - The Petri Net Approach*, London: Springer-Verlag, 2011.
- [13] R. Valk., "Self-modifying nets, a natural extension of Petri Nets," in *Proceedings of the Fifth Colloquium on Automata, Languages and Programming*, Springer-Verlag, 1978.
- [14] R. Hofestädt and S. Thelen, "Quantitative modeling of biochemical networks," *In Silico*

- Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 39-53, 1998.
- [15] R. David and H. Alla, "On Hybrid Petri Nets," *Discrete Event Dynamic Systems: Theory and Applications*, vol. 11, pp. 9-40, 2001.
  - [16] K. Jensen and L. M. Kristensen, *Coloured Petri Nets, Modelling and Validation of Concurrent Systems*, Berlin Heidelberg: Springer, 2009.
  - [17] M. Peleg, D. Rubin and R. Altman, "Using Petri Net tools to study properties and dynamics of biological systems," *J Am Med Inform Assoc.*, vol. 12, no. 2, pp. 181-99, 2005.
  - [18] D. T. Gillespie, "A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions.," *J. Comput. Phys.*, vol. 22, no. 4, pp. 403-434, 1976.
  - [19] S. Hardy and N. P. Robillard, "Modeling and simulation of molecular biology systems using Petri Nets: Modeling goals of various approaches," *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, vol. 2, no. 4, pp. 619-637, 2004.
  - [20] M. Heiner and I. Koch, "Petri Net Based Model Validation in Systems Biology," in *ICATPN*, Berlin/ Heidelberg, 2004.
  - [21] M. Huth and M. Ryan, *Logic in Computer Science*, 2nd ed., New York: Cambridge University Press, 2004.
  - [22] M. A. Blätke, M. Heiner and W. Marwan, "Tutorial, Petri Nets in Systems Biology," Otto-von-Guericke University Magdeburg, 2011.
  - [23] C. Rohr, W. Marwan and M. Heiner, "Snoopy - a unifying Petri Net framework to investigate biomolecular networks," *Bioinformatics*, vol. 26, no. 7, pp. 974-975, 2010.
  - [24] M. Schwarick, M. Heiner and C. Rohr, "MARCIE - Model Checking And Reachability analysis done effiCIently," in *8th International Conference on Quantitative Evaluation of SysTems*, Aachen, Germany, 2011.
  - [25] A. Tovchirechko, "Model Checking using interval decision diagrams, PhD Thesis," BTU Cottbus, Dep. of CS, Cottbus, 2008.
  - [26] W. J. Stewart, *Introduction to the Numerical Solution of Markov Chains*, Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1994.
  - [27] J. Ellerman, C. Brown, M. de Vera, H. Zeh, T. Billiar, A. Rubartelli and M. Lotze, "Masquerader: High Mobility Group Box-1 and Cancer," *Clinical Cancer Research*, vol. 13, pp. 2386-2848, 2007.
  - [28] M. T. Lotze and K. J. Tracey, "High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon

- in the immune arcenal," *Nature Reviews Immunology*, vol. 5, no. 4, pp. 331-342, 2005.
- [29] R. Kang, D. Tang, N. Schapiro, K. Livesey, A. Farkas, P. Loughran, M. Lotze and H. Zeh, "The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival," *Cell Death Differ*, vol. 17, no. 4, pp. 666-676, 2010.
- [30] H. Gong, P. Zuliani, A. Komuravelli, J. Faeder and C. Edmund, "Computational Modeling and Verification of Signaling Pathways in Cancer," in *Algebraic and Numeric Biology*, vol. 6479, Heidelberg, Springer Berlin, 2012, pp. 117-135.
- [31] J. Downward, "Targeting RAS signaling pathway in cancer therapy," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, pp. 11-22, 2003.
- [32] N. Bardeesy and R. DePihno, "Pancreatic Cancer Biology And Genetics," *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no. 12, pp. 897 - 909, 2002.
- [33] J. R. Faeder, M. L. Blinov and W. S. Hlavacek, "Rule-Based Modeling of Biochemical Systems with BioNetGen," in *Systems Biology*, vol. 500, Humana Press, 2009, pp. 113-167.
- [34] N. Geva-Zatorsky, N. Rosenfeld, S. Itzkovitz, R. Milo, A. Sigal, E. Dekel, T. Yarnitzky, Y. Liron, P. Polak, G. Lahav and U. Alon, "Oscillations and variability in the p53 system," *Molecular Systems Biology*, vol. 2, no. 33, 2006.

## Παράρτημα Α

Στο σημείο αυτό παρατίθεται ολόκληρο το μοντέλο, από το Snoopy σε μορφή ANDL. Είναι μια από τις μορφές αρχείων που μπορεί το Snoopy να παράξει και επιπλέον είναι εύκολα κατανοητή.

Χωρίζεται σε τρία τμήματα : Σταθερές ( ρυθμοί αντίδρασης ), Θέσεις και Μεταβάσεις. Για κάθε μετάβαση ορίζεται η αλλαγή που αυτή προκαλεί στο μαρκάρισμα και με ποιο ρυθμό την προκαλεί.

```
spn [HMGB1_model]
{
  constants:
    double d2 = 0.005;
    double d1 = 0.02;
    double k2 = 0.000054;
    double k1 = 0.00002;
    double k3 = 0.000003;
    double d3 = 0.000035;
    double k4 =
0.00000012;
    double d4 = 0.012;
    double k5 = 28;
    double d5 = 0.006;
    double k6 = 32;
    double d6 = 0.018;
    double k7 = 30;

    double d7 = 0.014;
    double k8 = 0.0000004;
    double d8 = 0.03;
    double d8p = 0.013;
    double k9 = 1200;
    double d9 = 0.012;
    double d10 = 0.018;
    double Ka = 80000;
    double Kb = 80000;
    double k10 = 8;
    double Kc = 80000;
    double a1 = 0.00002;
    double k2p =
0.0000003;
    double b1 = 0.0016;
    double a2 = 0.0000001;
    double b2 = 0.009;
```

```

double a3 = 0.0000004;      double b11 = 0.005;
double b3 = 0.0018;         double a12 = 170;
double a4 = 0.0000008;     double Ki = 300000;
double b4 = 0.002;         double b12 = 0.035;
double a5 = 90;             double d7p =
double Kd = 4000;           0.00000065;
double b5 = 0.012;         double b6p =
double a6 = 50;             0.00000003;
double Ke = 1000;          double b12p =
double a6p = 90;            0.00000003;
double Kf = 1000;          double a13 = 40;
double b6 = 0.035;         double b13 = 0.003;
double a7 = 0.0000001;     double dm1 = 0.009;
double b7 = 0.0005;        double b6pp =
double b7p = 0.0000006;    0.0000003;
double a8 = 0.000001;      double h0 = 27;
double b8 = 0.0000006;     double n1 = 1;
double b8p = 0.0004;       double n2 = 2;
double a9 = 40;            double n3 = 3;
double b9 = 0.0005;        double g0 = 0.02;
double a10 = 60;           double v0 = 100000;
double Kg = 1000;          double d9p =
double b10 = 0.0004;       0.00000006;
double a11 = 10;
double Kh = 300000;

```

**places:**

```

AKTp = 0;
AKTu = 100000;
ARF = 0;

```

```

CD = 0;
CE = 0;
DNA = 4000000;
DNAD = 0;
E2F = 0;
ERKp = 0;
ERKu = 10000;
HMGB1 = 1000;
I = 1;
INK4A = 0;
MDM2p = 20000;
MDM2u = 10000;
MEKp = 0;
MEKu = 10000;
Myc = 0;
P13Kp = 0;
P13Ku = 100000;

P21 = 0;
P53 = 20000;
PIPp = 0;
PIPu = 100000;
PTEN = 0;
RAFp = 0;
RAFu = 10000;
RAGEp = 0;
RAGEu = 1000;
RASp = 0;
RASu = 10000;
RBp = 0;
RBu = 0;
RE = 100000;
mdm2t = 0;
thrash = 0;

```

**observers:**

**transitions:**

```

d2 : : [P13Ku + 1] & [P13Kp - 1] : MassAction(d2);

k2 : : [P13Kp + 1] & [RAGEp + 1] & [P13Ku - 1] &
[RAGEp - 1] : MassAction(k2);

d1 : : [RAGEu + 1] & [RAGEp - 1] : MassAction(d1);

```

```

    k1 : : [RAGEp + 1] & [HMGB1 + 1] & [RAGEu - 1] &
[HMGB1 - 1] : MassAction(k1);

    b12p : : [P21 + 1] & [CE - 1] & [P21 - 1] :
MassAction(b12p);

    b6p : : [P21 + 1] & [CD - 1] & [P21 - 1] :
MassAction(b6p);

    d7p : : [ARF + 1] & [MDM2u - 1] & [ARF - 1] :
MassAction(d7p);

    d7p_2 : : [ARF + 1] & [MDM2p - 1] & [ARF - 1] :
MassAction(d7p);

    b7p : : [E2F + 1] & [RBp + 1] & [CE + 1] & [RE - 1]
& [CE - 1] : MassAction(b7p);

    b13 : : [thrash + 1] & [INK4A - 1] :
MassAction(b13);

    b6pp : : [INK4A + 1] & [CD - 1] & [INK4A - 1] :
MassAction(b6pp);

    a13 : : [INK4A + 1] & [I + 1] & [I - 1] :
MassAction(a13);

    Hill_g0_v0_n2 : : [DNA + 1] & [P53 + 1] & [DNAD - 1]
& [P53 - 1] : ((g0*P53^n2)/(v0^n2+P53^n2))*DNAD;

    d10 : : [thrash + 1] & [P21 - 1] : MassAction(d10);

    Hill_k10_kc_n2 : : [P21 + 1] & [P53 + 1] & [P53 - 1]
: (k10*P53^n2)/(Kc^n2+P53^n2);

    d5 : : [thrash + 1] & [PTEN - 1] : MassAction(d5);

    Hill_k5_ka_n3 : : [PTEN + 1] & [P53 + 1] & [P53 - 1]
: (k5*P53^n3)/(Ka^n3+P53^n3);

    d9p : : [MDM2p + 1] & [P53 - 1] & [MDM2p - 1] :
MassAction(d9p);

    d9 : : [thrash + 1] & [P53 - 1] : MassAction(d9);

    k9 : : [P53 + 1] & [I + 1] & [I - 1] :
MassAction(k9);

    Hill_k6_Kb_n3 : : [mdm2t + 1] & [P53 + 1] & [P53 -
1] : (k6*P53^n3)/(Kb^n3+P53^n3);

```

```

Hill_dm1_h0_n2 : : [DNAD + 1] & [MDM2p - 1] & [DNAD
- 1] : ((dm1*DNAD^n2)/(h0^n2+DNAD^n2))*MDM2p;

d7 : : [thrash + 1] & [mdm2t - 1] : MassAction(d7);

k7 : : [MDM2u + 1] & [mdm2t + 1] & [mdm2t - 1] :
MassAction(k7);

d8p : : [thrash + 1] & [MDM2p - 1] :
MassAction(d8p);

d7_2 : : [thrash + 1] & [MDM2u - 1] :
MassAction(d7);

d8 : : [MDM2u + 1] & [MDM2p - 1] : MassAction(d8);

k8 : : [MDM2p + 1] & [AKTp + 1] & [AKTp - 1] &
[MDM2u - 1] : MassAction(k8);

d4 : : [AKTu + 1] & [AKTp - 1] : MassAction(d4);

k4 : : [AKTp + 1] & [PIPP + 1] & [AKTu - 1] & [PIPP
- 1] : MassAction(k4);

d3 : : [PIPU + 1] & [PTEN + 1] & [PIPP - 1] & [PTEN
- 1] : MassAction(d3);

k3 : : [PIPP + 1] & [P13Kp + 1] & [PIPU - 1] &
[P13Kp - 1] : MassAction(k3);

b4 : : [ERKu + 1] & [ERKp - 1] : MassAction(b4);

a4 : : [MEKp + 1] & [ERKp + 1] & [MEKp - 1] & [ERKu
- 1] : MassAction(a4);

b3 : : [MEKu + 1] & [MEKp - 1] : MassAction(b3);

a3 : : [MEKp + 1] & [RAFp + 1] & [MEKu - 1] & [RAFp
- 1] : MassAction(a3);

b2 : : [RAFu + 1] & [RAFp - 1] : MassAction(b2);

a2 : : [RAFp + 1] & [RASp + 1] & [RASp - 1] & [RAFu
- 1] : MassAction(a2);

k2p : : [P13Kp + 1] & [RASp + 1] & [P13Ku - 1] &
[RASp - 1] : MassAction(k2p);

b1 : : [RASu + 1] & [RASp - 1] : MassAction(b1);

```

```

    a1 : : [RAGEp + 1] & [RASp + 1] & [RASu - 1] &
[RAGEp - 1] : MassAction(a1);

    b11 : : [thrash + 1] & [ARF - 1] : MassAction(b11);

    Hill_a11_kh_n1 : : [ARF + 1] & [E2F + 1] & [E2F - 1]
: (a11*E2F^n1)/(Kh^n1+E2F^n1);

    b12 : : [thrash + 1] & [CE - 1] : MassAction(b12);

    Hill_a12_ki_n1 : : [CE + 1] & [E2F + 1] & [E2F - 1]
: (a12*E2F^n1)/(Ki^n1+E2F^n1);

    b7 : : [thrash + 1] & [RE - 1] : MassAction(b7);

    b8p : : [thrash + 1] & [RBp - 1] : MassAction(b8p);

    b8 : : [RBu + 1] & [RBp - 1] : MassAction(b8);

    b9 : : [thrash + 1] & [RBu - 1] : MassAction(b9);

    a8 : : [RBp + 1] & [CD + 1] & [RBu - 1] & [CD - 1] :
MassAction(a8);

    a9 : : [RBu + 1] & [I + 1] & [I - 1] :
MassAction(a9);

    a7 : : [RE + 1] & [RBu - 1] & [E2F - 1] :
MassAction(a7);

    b10 : : [thrash + 1] & [E2F - 1] : MassAction(b10);

    b7p_2 : : [RBp + 1] & [E2F + 1] & [CD + 1] & [RE -
1] & [CD - 1] : MassAction(b7p);

    Hill_a10_kg_n1 : : [E2F + 1] & [Myc + 1] & [Myc - 1]
: (a10*Myc^n1)/(Kg^n1+Myc^n1);

    b6 : : [thrash + 1] & [CD - 1] : MassAction(b6);

    Hill_a6p_kf_n1 : : [CD + 1] & [Myc + 1] & [Myc - 1]
: (a6p*Myc^n1)/(Kf^n1+Myc^n1);

    Hill_a6_ke_n1 : : [CD + 1] & [ERKp + 1] & [ERKp - 1]
: (a6*ERKp^n1)/(Ke^n1+ERKp^n1);

    b5 : : [thrash + 1] & [Myc - 1] : MassAction(b5);

    Hill_a5_kd_n1 : : [Myc + 1] & [ERKp + 1] & [ERKp -
1] : (a5*ERKp^n1)/(Kd^n1+ERKp^n1); }

```