



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΗΛΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΩΝ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
"ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ"**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Εφαρμογή μεθόδων Συστημικής Βιολογίας για την
κατανόηση του ρόλου της α-συνουκλεΐνης
στην παθογένεση της νόσου του Πάρκινσον**

Ελευθέριος Ν. Ουζούνογλου

Επιβλέπων: Ηλίας Μανωλάκος, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εφαρμογή μεθόδων Συστημικής Βιολογίας
για την κατανόηση του ρόλου της α-συνουκλεΐνης
στην παθογένεση της νόσου του Πάρκινσον

Application of Systems Biology methods
in the elucidation of alpha-synuclein's role
in the pathogenesis of Parkinson's Disease

Ελευθέριος Ν. Ουζούνογλου
A.M.: ΠΙΒ032

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: **Ηλίας Μανωλάκος**, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: **Κώστας Βεκρέλλης**, Ερευνητής Γ', ΙΙΒΕΑΑ
 Κάτια Καραλή, Ερευνήτρια Β', ΙΙΒΕΑΑ

Νοέμβριος 2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Συστημική Βιολογία, αποτελεί τον πλέον ραγδαία αναπτυσσόμενο κλάδο της Υπολογιστικής Βιολογίας και ως κύριο στόχο έχει την αξιοποίηση της διαθέσιμης ποιοτικής γνώσης αλλά και της αυξανόμενης διαθεσιμότητας πολυποικίλων βιολογικών δεδομένων από το μοριακό επίπεδο, για την δημιουργία κατάλληλων μαθηματικών και υπολογιστικών μοντέλων που να επιτρέπουν την μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς των βιολογικών συστημάτων, αλλά και την αποδοτικότερη έρευνα επί αυτών μέσω των μεθόδων προσομοίωσης και δοκιμής υποθέσεων.

Τα τελευταία χρόνια, έχουν παρουσιαστεί σημαντικά ευρήματα σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της Νόσου του Πάρκινσον. Μεταξύ αυτών, οι κυριότερες επιτυχίες αφορούν στην εύρεση της συμμετοχής της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης αλλά και των συνεπειών της μετάλλαξης ή της υπερ-έκφρασής της. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη έχει συσχετιστεί γενετικά με την Νόσο του Πάρκινσον ενώ τα εργαστηριακά ευρήματα συγκλίνουν στο ότι βασικός μηχανισμός της έκφρασης της παθογενούς συμπεριφοράς της αποτελεί η δημιουργία ολιγομερών μοριακών οντοτήτων της α-συνουκλεΐνης. Συνέπεια της μη φυσιολογικής λειτουργίας της α-συνουκλεΐνης αποτελεί ο κυτταρικός θάνατος των νευρώνων στους οποίους αυτή υπερ-εκφράζεται ή εκφράζεται μεταλλαγμένη ενώ έχει βρεθεί ότι εμφανίζονται σημαντικές επιπτώσεις σε διάφορους ζωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων, κυρίως τους πρωτεολυτικούς. Η εξακρίβωση, των σχετικών με την α-συνουκλεΐνη, βιολογικών μηχανισμών που οδηγούν στον συγκεκριμένο νευροεκφυλισμό είναι μία ιδιαίτερα δύσκολη διαδικασία και έτσι, η συμβολή της επιστήμης της Πληροφορικής, μέσω της Συστημικής Βιολογίας, κρίνεται αναγκαία ώστε να καταστεί εφικτή η διαχείριση της πολυπλοκότητας του προβλήματος αλλά και της ετερογένειας των πληροφοριών σχετικά με τα παρατηρούμενα φαινόμενα.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, επιχειρήθηκαν τα πρώτα βήματα για την δημιουργία ενός υπολογιστικού μοντέλου Συστημικής Βιολογίας το οποίο θα είναι ικανό να προσομοιώνει τα σχετικά με την υπερ-έκφραση της α-συνουκλεΐνης δυναμικά φαινόμενα και ειδικότερα αυτά του ολιγομερισμού, της αποδόμησής από τους διάφορους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς του κυττάρου αλλά και την καταπίεση αυτών λόγω της παθογενούς συμπεριφοράς της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Το δίκτυο βιοχημικών αντιδράσεων που αναπτύχθηκε, εκπαιδεύτηκε με τη χρήση εργαστηριακών δεδομένων. Παρά τη σχετικά περιορισμένη ποσότητα δεδομένων, το μοντέλο προσομοιώνει ιδιαίτερα ικανοποιητικά τα παρατηρούμενα φαινόμενα. Ιδιαίτερα σημαντικό επίτευγμα αποτελεί η ικανότητα του δικτύου να προβλέπει την δυναμική συμπεριφορά του βιολογικού συστήματος όταν σε αυτό έχουν γίνει διάφορες εργαστηριακές παρεμβάσεις, παρότι δεν είχε προηγηθεί καμία εκπαίδευση των παραμέτρων του σχετικά με αυτές τις περιπτώσεις. Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί θετική ένδειξη όσον αφορά την ορθότητα και ικανότητα προβλέψεων του μοντέλου. Έχοντας ως βάση το συγκεκριμένο μοντέλο σχεδιάζεται η δημιουργία ενός πολυεπίπεδου μοντέλου που θα προσομοιώνει και άλλα σχετικά με την α-συνουκλεΐνη φαινόμενα (π.χ. την έκκριση της πρωτεΐνης, την δράση της στον μεσοκυττάριο χώρο κτλ.), με τελικό στόχο την συνδρομή στις αναζητήσεις των μηχανισμών ανάπτυξης της Νόσου του Πάρκινσον.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Συστημική Βιολογία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Νόσος του Πάρκινσον, α-συνουκλεΐνη, δίκτυα βιοχημικών αντιδράσεων, μοντελοποίηση, in silico πειράματα.

ABSTRACT

Systems Biology is the most rapidly evolving field of Computational Biology. Its main objective is to make optimal use of the available qualitative knowledge and the increasing availability of a wide variety of heterogeneous biological data from the molecular level, in order to create mathematical and/or computational models that allow the study of the dynamical behavior of biological systems and also facilitate the more efficient research on these systems using in-silico methods, such as simulation and hypothesis testing.

In recent years, important findings regarding the molecular mechanisms involved in the development of Parkinson's Disease have appeared in the literature. Among them, key successes have to do with the elucidation of the contribution of alpha-synuclein (ASYN) and the consequences of its mutation or overexpression in neurodegeneration. This important protein has been genetically associated with Parkinson's Disease and experimental findings suggest that the central mechanism of pathogenesis is related to the creation of oligomeric molecular species of alpha-synuclein. A consequence of the abnormal function of ASYN is the death of neurons in which the protein is over-expressed, or expressed in a mutant form. Furthermore ASYN has also been found to affect in significant ways several key cell operations, most notably the proteolytic mechanism. However, the verification of the alpha-synuclein related biological phenomena that lead to neurodegeneration is a very difficult process, so the contribution of computer science, through systems biology, is crucial so as to make manageable the complexity of the problem and handle the heterogeneity of information on the observed phenomena.

In this Master's thesis, we take the first steps towards creating a Systems Biology oriented computational model, capable to simulate the alpha-synuclein over-expression related dynamic phenomena in the cell and especially those concerning its oligomerization, the degradation by different proteolytic mechanisms and the inhibition of those due to pathogenic behavior of this protein.

The developed biomolecular reactions model was trained by using available experimental data from the laboratory. Despite the relatively limited amount of data used, the model simulates particularly well the observed phenomena. An important accomplishment is the ability of the model to predict the dynamical behavior of the cell when various experimental interventions are applied, although no parameter learning procedure has been applied specific to these cases. This result is a positive indication for the accuracy of the model and for its predictive capabilities. Starting from this as a base, a multi-scale model that will simulate additional alpha-synuclein related phenomena (e.g. the secretion and uptake of the protein as well as its actions in the intercellular space) is planned, aiming to assist in the elucidation of ASYN's role in the development of Parkinson's Disease.

SUBJECT AREA: Systems Biology

KEYWORDS: Parkinson's Disease, alpha-synuclein, biochemical networks, modeling, in silico experiments.

Σε όσους, αν και το αξίζουν, δεν τους δίνονται οι ίδιες ευκαιρίες με εμένα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως, επιθυμώ να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον επιβλέποντά μου κ. Ηλία Μανωλάκο, Αν. Καθ. του Τμήματος Πληροφορικής και Τηλεπικοινωνιών του ΕΚΠΑ ο οποίος με τη διορατικότητά του, μου πρότεινε την ενασχόληση με τον ιδιαίτερα ενδιαφέροντα χώρο της Συστημικής Βιολογίας, ένα ραγδαία εξελισσόμενο τομέα της Υπολογιστικής Βιολογίας, που προβλέπεται να αποτελέσει την βασική οδό προόδου σε αυτή στα επόμενα χρόνια και έχει ήδη καθορίσει την επιλογές μου για την συνέχιση της σταδιοδρομίας μου. Η συμβολή του ήταν καθοριστική και κατά την εκπαίδευσή μου σχετικά με τις μεθόδους και τα εργαλεία Συστημικής Βιολογίας αλλά και κατά την αναζήτηση ενδιαφέροντος προβλήματος άμεσης εφαρμογής αυτών, με την πρόταση συνεργασίας με την Ομάδα Νευροεκφυλιστικών Ασθενειών του ΙΙΒΕΑΑ. Επίσης, η καθοδήγηση, η παρακίνηση και βοήθεια του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας ήταν ανεκτίμητες.

Ακολουθώντας, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Κώστα Βεκρέλλη, Ερευνητή Γ' ΙΙΒΕΑΑ, επικεφαλή της Ομάδας Νευροεκφυλιστικών Ασθενειών του ΙΙΒΕΑΑ, ο οποίος αποδεχόμενος την πρόταση συνεργασίας, ενέσκηψε πάνω στα προβλήματα της Υπολογιστικής Μοντελοποίησης Βιολογικών Συστημάτων και συνέβαλε τα μέγιστα, παρέχοντας και επεξηγώντας την διαθέσιμη βιολογική γνώση αλλά και προσφέροντας τα αναγκαία για την εργασία εργαστηριακά δεδομένα. Επίσης τον ευχαριστώ ιδιαίτερα για το πολύ θερμό κλίμα συνεργασίας.

Επιθυμώ, επίσης, να ευχαριστήσω τον Δρ. Λεωνίδα Στεφανή, επικεφαλή της Ομάδας Νευροεκφυλιστικών Ασθενειών, του οποίου τα πολύτιμα σχόλια συνέβαλαν στη συνεχή βελτίωση του αναπτυχθέντος Υπολογιστικού Μοντέλου.

Ακόμα, οφείλω να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Κάτια Καραλή για την συμμετοχή της στην εξεταστική επιτροπή της εργασίας, για τα πολύτιμα σχόλια της και για την παρακίνηση ενασχόλησης με τον χώρο της Συστημικής Βιολογίας.

Ιδιαίτερα σημαντική, επίσης, ήταν η συμβολή των μετα-διδασκόντων ερευνητών της Ομάδας, Δρ. Μαρίας Ξυλούρη και Δρ. Ευαγγελίας Εμμανουηλίδου, οι οποίες διέθεσαν πολύτιμο χρόνο για την επεξήγηση των παρατηρούμενων βιολογικών φαινομένων αλλά και την προσαρμογή τους στα πλαίσια υπολογιστικής μοντελοποίησης. Ακόμα, κρίσιμη ήταν η βοήθεια των φοιτητών της Ομάδας, Κατερίνας Μελαχρινού, Μεθόδου Ξημεράκη και Ζωής Χρυσοπούλου για την παραγωγή, επεξεργασία και τεκμηρίωση των εργαστηριακών δεδομένων, τους οποίους ευχαριστώ ιδιαίτερα.

Ευχαριστώ, επίσης, τον Δρ. Δημήτρη Καλαματιανό, για τα πολύ σημαντικά και ενδελεχή σχόλιά του επί της εργασίας.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της ομάδας για την In Silico Ογκολογία (In Silico Oncology Group) του εργαστηρίου Μικροκυμάτων και Οπτικών Ινών της Σχολής Ηλεκτρολόγων του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου, της οποίας είμαι μέλος, και ειδικότερα τους Ερευνητές Δρ. Γιώργο Σταματάκο και Δρ. Δήμητρα Διονυσίου για την υποστήριξή τους αλλά και την κατανόηση που έδειξαν.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την διαχρονική υποστήριξή της και την παροχή εφοδίων για την συνεχή βελτίωση της εκπαίδευσής μου, την σύντροφό μου για την συνεχή υποστήριξη και υπομονή της αλλά και το νεότερο μέλος της οικογένειάς μου, που πρόσφατα μου έδωσε τον σημαντικότερο, μέχρι σήμερα, τίτλο αυτόν του Θείου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	23
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	25
1.1 Η βιολογική έρευνα μέχρι και την αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος	25
1.2 Η συμβολή της Πληροφορικής στην αποκωδικοποίηση και στην ανάλυση του γονιδιώματος. Η γέννηση της Βιοπληροφορικής	28
1.3 Από την Βιοπληροφορική στη Συστημική Βιολογία	30
1.4 Συστημική Βιολογία	31
1.5 Συστημική Βιολογία και Νόσος του Πάρκινσον. Στόχοι, Συνεισφορά και Διάρθρωση της Εργασίας	32
2. ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΚΤΥΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ	35
2.1 Θεωρητικό Πλαίσιο Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων	35
2.2 Μέθοδοι Προσομοίωσης Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων	42
2.2.1 Ντετερμινιστική Προσομοίωση	45
2.2.2 Στοχαστική Προσομοίωση	47
2.2.2.1 Ο αλγόριθμος SSA	50
2.2.2.2 Η μέθοδος της Επόμενης Αντίδρασης	51
2.3 Εναλλακτικές Μέθοδοι Προσομοίωσης	53
2.3.1 Προσομοίωση με άλματα	53
2.3.2 Προσομοίωση μέσω Στοχαστικών Διαφορικών Εξισώσεων	54
2.3.3 Υβριδική Προσομοίωση	56
2.4 Ανάλυση και Εκπαίδευση Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων	57
2.4.1 Μέθοδοι Ανάλυσης Βιοχημικών Δικτύων	57
2.4.1.1 Ανάλυση Ευαισθησίας	57
2.4.1.2 Άλλες μέθοδοι Ανάλυσης	60
2.4.2 Εκπαίδευση Βιοχημικών Δικτύων-Εκτίμηση Παραμέτρων	61
2.4.2.1 Εκτίμηση Παραμέτρων μέσω μεθόδων Βελτιστοποίησης	62
2.4.2.1.1 Θεωρητικό Πλαίσιο Εκτίμησης Παραμέτρων μέσω Μεθόδων Βελτιστοποίησης	62
2.4.2.1.2 Καταλληλότητα Εφαρμογής μεθόδων Βελτιστοποίησης και Κυριότερες Μέθοδοι	63
2.4.2.1.3 Συμπεράσματα από τη Βιβλιογραφία, Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα των μεθόδων Βελτιστοποίησης	67
2.4.2.2 Εναλλακτικές μέθοδοι Εκτίμησης Παραμέτρων	68
2.4.2.3 Συμπεράσματα ανασκόπησης μεθόδων Εκτίμησης Παραμέτρων	69
3. ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ ΚΑΙ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗ	71

3.1	Η Νόσος του Πάρκινσον	71
3.2	Νόσος του Πάρκινσον και α-συνουκλεΐνη	73
3.2.1	Η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη.....	73
3.2.2	Συσχέτιση της α-συνουκλεΐνης με τη νόσο του Πάρκινσον.....	74
3.2.3	Ερευνητικά ευρήματα για τα σχετικά με την α-συνουκλεΐνη φαινόμενα	74
3.2.3.1	Α-συνουκλεΐνη και κυτταρικός θάνατος.....	75
3.2.3.2	Ο ολιγομερισμός της α-συνουκλεΐνης	77
3.2.3.3	Α-συνουκλεΐνη και πρωτεολυτικοί μηχανισμοί	78
3.2.3.3.1	Α-συνουκλεΐνη, Διαμεσολαβούμενη από Σαπερόνες Αυτοφαγία και Λυσοσώματα	78
3.2.3.3.2	Α-συνουκλεΐνη και Μακροαυτοφαγία.....	82
3.2.3.3.3	Α-συνουκλεΐνη και Πρωτεάσωμα	84
3.2.3.4	Επιπλέον μηχανισμοί και φαινόμενα που επηρεάζονται από την α-συνουκλεΐνη	85
4.	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗΣ ΣΤΙΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΩΝ ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ.....	87
4.1	Υπολογιστική μοντελοποίηση της επιρροής της υπερ-έκφρασης και του ολιγομερισμού της α-συνουκλεΐνης στην νευρωνική ομοιόσταση.....	87
4.1.1	Στόχοι.....	87
4.1.2	Δημιουργία της Δομής του μοντέλου	88
4.1.2.1	Η δομή του μοντέλου, πηγές γνώσεις και βασικές παραδοχές	88
4.1.2.1.1	Μοντελοποίηση παραγωγής και τροποποίησης της α-συνουκλεΐνης	89
4.1.2.1.2	Μοντελοποίηση του ολιγομερισμού της α-συνουκλεΐνης.....	90
4.1.2.1.3	Μοντελοποίηση της αποδόμησης από τη διαμεσολαβούμενη από σαπερόνες αυτοφαγία και καταπίεση αυτής.....	94
4.1.2.1.4	Μοντελοποίηση της αποδόμησης από την μακροαυτοφαγία	98
4.1.2.1.5	Μοντελοποίηση της αποδόμησης από το πρωτεάσωμα και της καταπίεσης αυτού	102
4.1.3	Μαθηματικός Ορισμός και Εκπαίδευση του Μοντέλου	105
4.1.3.1	Ορισμός Βιοχημικών Νόμων και Ομάδων Παραμέτρων	105
4.1.3.2	Πηγές Τιμών Παραμέτρων	110
4.1.3.3	Πηγές και τύποι Δεδομένων.....	111
4.1.3.4	Διαδικασία Εκπαίδευσης του Μοντέλου	116
4.1.3.4.1	Εκτίμηση συγκεκριμένων παραμέτρων μέσω υπό-μοντέλων ..	116
4.1.3.4.2	Χειροκίνητη μικρο-ρύθμιση των παραμέτρων	120
4.1.3.4.3	Ανάλυση Ευαισθησίας	122
4.1.3.4.4	Εκτίμηση Παραμέτρων.....	126

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΩΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ	137
5.1 Προσομοίωση των παρατηρήσιμων φαινομένων. Υπερ-έκφραση της α-συνουκλεΐνης.....	137
5.2 Ικανότητες Πρόβλεψης	139
5.2.1 Έλεγχος υπόθεσης μείωσης του ρυθμού παραγωγής της α-συνουκλεΐνης	140
5.2.2 Έλεγχος υπόθεσης τριπλασιασμού των επιπέδων του υποδοχέων Lamp2a	142
5.2.3 Έλεγχος υπόθεσης απενεργοποίησης της παραγωγής Ντοπαμίνης	145
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ	149
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	151
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	155
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	157
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	181
ΑΝΑΦΟΡΕΣ	183

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1 Ο κύκλος της Συστημικής Βιολογίας [23]	32
Σχήμα 2.1 Παράδειγμα Ντετερμινιστικής Προσομοίωσης	43
Σχήμα 2.2 Παράδειγμα Στοχαστικής Προσομοίωσης (1 ^η εκτέλεση).....	44
Σχήμα 2.3 Παράδειγμα Στοχαστικής Προσομοίωσης (2 ^η εκτέλεση).....	44
Σχήμα 2.4 Η φιλοσοφία του αλγορίθμου Tau-leaping [42].....	54
Σχήμα 2.5 Η σχέση μεταξύ των διαφόρων μεθόδων προσομοίωσης	55
Σχήμα 2.6 Η φιλοσοφία των υβριδικών αλγορίθμων προσομοίωσης [42]	56
Σχήμα 2.7 Παράδειγμα εκτέλεσης του αλγορίθμου Simulated Annealing	64
Σχήμα 2.8 Η φιλοσοφία του αλγορίθμου Evolutionary Programming [57].....	65
Σχήμα 2.9 Η φιλοσοφία του αλγορίθμου Genetic Algorithm [57]	66
Σχήμα 3.1: Μέτρηση της βιωσιμότητας κυττάρων SH-SY5Y κατά την υπερ-έκφραση της WT ASYN [87]	76
Σχήμα 3.2: Ποσοστιαία σύγκριση της αποδόμησης της ΔDQ/WT ASYN σε σχέση με την WT ASYN [86]	79
Σχήμα 3.3: Σύγκρισης της επιρροής στην συνολική λυσωσωμική πρωτεόλυση των διαφόρων μεταλλάξεων της ASYN [88]	80
Σχήμα 3.4: Σύγκριση της βιωσιμότητας των κυττάρων SH-SY5Y κατά την υπερ-έκφραση της WT και της ΔDQ/WT ASYN [88]	80
Σχήμα 3.5: Μέτρηση της επιρροής της Ντοπαμίνης στην πρωτεολυτική δυσλειτουργία και στην μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων [88]	81
Σχήμα 3.6: Η συμμετοχή της Μακροαυτοφαγίας στον κυτταρικό θάνατο κατά την υπερ-έκφραση της WT ASYN [88]	84
Σχήμα 4.1 Τα βήματα δημιουργίας του μοντέλου	116
Σχήμα 4.2: Αποτελέσματα προσομοίωσης του υπομοντέλου αποδόμησης της ΔDQ/WT ASYN από την μακροαυτοφαγία, πριν την εκτίμηση παραμέτρων	119
Σχήμα 4.3: Αποτελέσματα προσομοίωσης του υπομοντέλου αποδόμησης της ΔDQ/WT ASYN από την μακροαυτοφαγία, μετά την εκτίμηση παραμέτρων	119
Σχήμα 4.4 Αποτέλεσμα προσομοίωσης μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Genetic Algorithm	130
Σχήμα 4.5 Αποτέλεσμα προσομοίωσης (μονομερής WT ASYN) μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Genetic Algorithm	130
Σχήμα 4.6 Αποτέλεσμα προσομοίωσης μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Genetic Algorithm Stochastic Ranking	131
Σχήμα 4.7 Αποτέλεσμα προσομοίωσης (μονομερής WT ASYN) μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Genetic Algorithm Stochastic Ranking.....	131
Σχήμα 4.8 Αποτέλεσμα προσομοίωσης μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Evolutionary Strategy	132
Σχήμα 4.9 Αποτέλεσμα προσομοίωσης (μονομερής WT ASYN) μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Evolutionary Strategy.....	132

Σχήμα 4.10 Αποτέλεσμα προσομοίωσης μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Particle Swarm.....	133
Σχήμα 4.11 Αποτέλεσμα προσομοίωσης (μονομερής WT ASYN) μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Particle Swarm.....	133
Σχήμα 5.1 Αποτελέσματα στοχαστικής προσομοίωσης προταθέντος μοντέλου. Υπερ-έκφραση της WT ASYN.	137
Σχήμα 5.2 Αποτελέσματα (μονομερής WT ASYN) στοχαστικής προσομοίωσης προταθέντος μοντέλου. Υπερ-έκφραση της WT ASYN.....	138
Σχήμα 5.3 1 Πρόβλεψη συμπεριφοράς συστήματος κατά την μείωση της υπερ-έκφρασης της WT ASYN κατά 50%.	141
Σχήμα 5.4 Πρόβλεψη συμπεριφοράς (μονομερής WT ASYN) συστήματος κατά την μείωση της υπερ-έκφρασης της WT ASYN κατά 50%.	141
Σχήμα 5.5 Πρόβλεψη συμπεριφοράς συστήματος κατά τον τριπλασιασμό των επιπέδων του Lamp2a.....	142
Σχήμα 5.6 Πρόβλεψη συμπεριφοράς συστήματος κατά τον τριπλασιασμό των επιπέδων του Lamp2a (παρουσίαση σε περιορισμένα επίπεδα).....	143
Σχήμα 5.7 Πρόβλεψη συμπεριφοράς (μονομερής WT ASYN) συστήματος κατά τον τριπλασιασμό των επιπέδων του Lamp2a	143
Σχήμα 5.8 Πρόβλεψη συμπεριφοράς συστήματος κατά την απενεργοποίηση της παραγωγής της Ντοπαμίνης	145
Σχήμα 5.9 Πρόβλεψη συμπεριφοράς (μονομερής WT ASYN) συστήματος κατά την απενεργοποίηση της παραγωγής της Ντοπαμίνης	146

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1 Παράδειγμα της γλώσσας Περιγραφής Διαδικασίας της SBGN [32]	39
Εικόνα 2.2 Παράδειγμα της γλώσσας Σχέσης Οντοτήτων της SBGN [32]	40
Εικόνα 2.3 Παράδειγμα της γλώσσας Ροής Δραστηριότητας της SBGN [32]	40
Εικόνα 2.4 Χάρτης των κανόνων της SBGN	40
Εικόνα 2.5 Αναπαράσταση του Μοντέλου του Schlögl σε SBGN	41
Εικόνα 2.6 Αναπαράσταση της κεντρικής ιδέας του αλγορίθμου Particle Swarm [57] ...	66
Εικόνα 3.1 Η περιοχή Μέλαινα Ουσία (substantia nigra) του εγκεφάλου	71
Εικόνα 3.2 Χαρακτηριστική μορφή σωματίου Lewy και η παρουσία της α -συνουκλεΐνης σε αυτό	72
Εικόνα 3.3 Χαρακτηριστική εικόνα του ασθενούς με ΝτΠ	72
Εικόνα 3.4: Βασικά βήματα της Διαμεσολοβούμενης από Σαπερόνες Αυτοφαγίας [96]	79
Εικόνα 3.5 Τα κεντρικά βήματα της Μακροαυτοφαγίας [96]	82
Εικόνα 4.1: Συνολική δομή του μοντέλου υπερ-έκφρασης της ASYN και των σχετικών φαινομένων (σε SBGN)	88
Εικόνα 4.2 Τμήμα του μοντέλου. Παραγωγή WT ASYN και Dopamine και τροποποίηση της WT ASYN	89
Εικόνα 4.3 Τμήμα μοντέλου. Ολιγομεσμός της WT ASYN (σε SBGN)	90
Εικόνα 4.4: Τμήμα μοντέλου. Αποδόμηση της ASYN από το CMA και η καταπίεση αυτού.	94
Εικόνα 4.5: Τμήμα μοντέλου. Αποδόμηση της ASYN από την Μακροαυτοφαγία (σε SBGN)	98
Εικόνα 4.6 Τμήμα μοντέλου. Αποδόμηση των ολιγομερών της ASYN από το πρωτεάσωμα και καταπίεση αυτού (σε SBGN)	102
Εικόνα 4.7 Παράδειγμα αποτελέσματος Western Blot Analysis σε SH-SY5Y κύτταρα κατά την υπερ-έκφραση της WT ASYN και παρατήρηση ολιγομερών	112
Εικόνα 4.8 Υπομοντέλο. Ολιγομερισμός και αποδόμηση της ΔDQ/WT ASYN (σε SBGN)	117

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1 Ο Στοιχειομετρικός πίνακας του Μοντέλου του Schlögl	41
Πίνακας 4.1: Αντιδράσεις του τμήματος παραγωγής και τροποποίησης της α-συνουκλεΐνης	90
Πίνακας 4.2: Αντιδράσεις του τμήματος ολιγομερισμού της α-συνουκλεΐνης	91
Πίνακας 4.3: Αντιδράσεις του τμήματος αποδόμησης από τη διαμεσολαβούμενη από σαπερόνες αυτοφαγία και καταπίεσης αυτής.....	95
Πίνακας 4.4: Αντιδράσεις του τμήματος αποδόμησης από την μακροαυτοφαγία	99
Πίνακας 4.5: Αντιδράσεις του τμήματος της αποδόμησης από το πρωτεάσωμα και της καταπίεσης αυτού	103
Πίνακας 4.6: Πίνακας Ομαδοποίησης Παραμέτρων για το τμήμα Ολιγομερισμού	106
Πίνακας 4.7: Πίνακας Ομαδοποίησης Παραμέτρων για το τμήμα της αποδόμησης από και της καταπίεσης του CMA	108
Πίνακας 4.8: Πίνακας Ομαδοποίησης Παραμέτρων για το τμήμα αποδόμησης από την μακροαυτοφαγία	108
Πίνακας 4.9: Πίνακας Ομαδοποίησης Παραμέτρων για το τμήμα του Πρωτεασώματος	109
Πίνακας 4.10 Πίνακας των ποσοτικοποιήσεων των διαθέσιμων δεδομένων	115
Πίνακας 4.11: Πίνακας των ημι-ποσοτικοποιημένων δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση του υπο-μοντέλου.....	118
Πίνακας 4.12 Αποτελέσματα Ανάλυσης Ευαισθησίας για τη Μονομερή ASYN.....	123
Πίνακας 4.13 Αποτελέσματα Ανάλυσης Ευαισθησίας για τη Διμερή ASYN	124
Πίνακας 4.14 Αποτελέσματα Ανάλυσης Ευαισθησίας για τα ολιγομερή της ASYN.....	125
Πίνακας 4.15 Ρυθμίσεις εκτίμησης παραμέτρων	126
Πίνακας 4.16 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων αλγορίθμων εκτίμησης παραμέτρων	134
Πίνακας 4.17 Αποτελέσματα εκτίμησης παραμέτρων και αποδεχθείσες τιμές.....	134

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία αποτελεί αναπόσπαστο και υποχρεωτικό, για την λήψη του Διπλώματος, κομμάτι των Μεταπτυχιακών μου σπουδών στο Διεπιστημονικό και Διιδρυματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών «Τεχνολογίες Πληροφορικής στην Ιατρική και τη Βιολογία» που οργανώνεται από το τμήμα Πληροφορικής και Τηλεπικοινωνιών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στο οποίο επίσης συμμετέχουν το Ίδρυμα ΙατροΒιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, το Ινστιτούτο Πληροφορικής και Τηλεπικοινωνιών του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος και το Τμήμα Τεχνολογίας Ιατρικών Οργάνων του ΤΕΙ Αθήνας. Η εργασία, εκπονήθηκε στην Αθήνα, υπό την επίβλεψη του Αν.Καθ. Ηλίας Μανωλάκου, κατά το τελευταίο εξάμηνο των σπουδών μου (Φεβρουάριος-Οκτώβριος 2011), ενώ η απαραίτητη αναζήτηση της σχετικής με το αντικείμενο της Συστημικής Βιολογίας βιβλιογραφίας, πραγματοποιήθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της παρακολούθησης του προγράμματος.

Στα πλαίσια της εκπόνησης της εργασίας, καθοριστικό ρόλο διαδραμάτισε η συνεργασία με την Ομάδα Νευροεκφυλιστικών Ασθενειών του τομέα Βασικής Νευροεπιστήμης του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών (ΙΙΒΕΑΑ), υπό την καθοδήγηση του Δρ. Κώστα Βεκρέλλη, για την απόκτηση της απαραίτητης βιολογικής γνώσης αλλά και των αναγκαίων εργαστηριακών δεδομένων. Η συνεργασία αυτή έθεσε τους στόχους της εργασίας σε άμεση συσχέτιση με τους ερευνητικούς στόχους της συγκεκριμένης ομάδας, που αφορούν την ανάπτυξη και την εξέλιξη της Νόσου του Πάρκινσον, ενώ αποτελεί εγγύηση για την άμεση αναφορά της σε υπαρκτά εργαστηριακά ευρήματα σχετικά με αυτή.

Τα αρχικά αποτελέσματα της εργασίας παρουσιάστηκαν στην Επιστημονική Διήμερη Συνάντηση που πραγματοποιήθηκε στο ΙΙΒΕΑΑ τις ημέρες 24-25 Ιουνίου 2011 με τη μορφή αναρτημένης παρουσίας (poster) υπό τον τίτλο "In silico modeling of alpha-synuclein effects on neuronal homeostasis., Eleftherios Ouzounoglou, Kostas Vekrellis and Elias S. Manolakos", ενώ η τελική τους μορφή έγινε δεκτή κατόπιν κρίσης και παρουσιάστηκε με τη μορφή poster στο μεγαλύτερο ετήσιο Διεθνές Συνέδριο για τη Συστημική Βιολογία (International Conference on Systems Biology, ICSB 2011) που πραγματοποιήθηκε στο Μανχάιμ της Γερμανίας την περίοδο 28 Αυγούστου-1 Σεπτεμβρίου 2011, υπό τον τίτλο "In silico Modeling of Alpha-synuclein Oligomerization Effects on Neuronal Homeostasis, E. Ouzounoglou, K. Vekrellis, E. Manolakos" (PS 578, Abstract Book p.291).

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η βιολογική έρευνα μέχρι και την αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος

Αν και η μελέτη της έμβιας φύσης, των κανόνων αυτής αλλά και των διαφορών ειδών αναφέρεται από αρχαιολόγους χρόνων στην ανθρώπινη ιστορία (με σημαντικές αναφορές στην Αιγυπτιακή και την Κινέζικη Ιατρική, τις μελέτες του Αριστοτέλη για την ταξινόμηση των ειδών, την συνεισφορά του Ιπποκράτη και του Γαληνού στην Ιατρική και τη Φαρμακολογία αλλά τα σημαντικά επιτεύγματα των Μουσουλμάνων Φυσιολόγων [1]), είναι κοινώς αποδεκτό ότι από τον 19^ο αιώνα η επιστήμη της βιολογίας, που πλέον ορίζεται ως διακριτός επιστημονικός χώρος, έχει να επιδείξει ιδιαίτερα σημαντικά επιτεύγματα τα οποία ραγδαία άλλαξαν τον τρόπο με τον οποίο η ανθρωπότητα αντιλαμβάνεται τη φύση αλλά και τον ίδιο της τον εαυτό. Στις ακόλουθες παραγράφους επιχειρείται να δοθούν τα σημαντικότερα από αυτά τα επιτεύγματα τα οποία καθόρισαν την εξέλιξη της βιολογικής έρευνας στον 20^ο και στον 21^ο αιώνα, όπως παρουσιάζονται στην [2].

Στην διάρκεια του 19^{ου} αιώνα πραγματοποιήθηκαν τα βασικά βήματα έτσι ώστε να καθοριστεί η οπτική με την οποία αντιλαμβανόμαστε σήμερα την βιολογία. Το 1859 ο Charles Darwin δημοσιεύει το βιβλίο του «Η Καταγωγή των Ειδών» (On the Origin of Species) [3]. Το έργο αυτό του Δαρβίνου εισήγαγε την θεωρία ότι οι πληθυσμοί εξελίσσονται από γενιά σε γενιά με τη διαδικασία της φυσικής επιλογής. Ουσιαστικά πρότεινε τη θεωρία της εξέλιξης υποστηρίζοντας ότι κάτι τέτοιο ισχύει και για τον άνθρωπο. Μία άλλη σημαντική συνεισφορά έγινε από τον Gregor Mendel ο οποίος ουσιαστικά όρισε τον επιστημονικό τομέα της γενετικής (genetics) [4], αποδεικνύοντας μέσω των πειραμάτων του σε φασόλια, ότι η κληρονομικότητα ακολουθεί συγκεκριμένα μοτίβα, τα οποία πλέον αποτελούν τους νόμους για την κληρονομικότητα του Mendel [5]. Το 1869 ο Friedrich Miescher απομόνωσε για πρώτη φορά υλικό DNA, στην προσπάθειά του να μελετήσει την χημεία των κυττάρων. Το υλικό που απομόνωσε ήταν πλούσιο σε φώσφορο και του έδωσε το όνομα νουκλεΐνη (nuclein). Στις αρχές του 20^{ου} αιώνα τον ακολούθησαν πολύ ερευνητές, ανακαλύπτοντας τις χημικές ιδιότητες του DNA σε βάθος. Τέλος, μία ιδιαίτερα σημαντική βιολογική ανακάλυψη του 19^{ου} αιώνα ήταν η περιγραφή της μίτωσης κατά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, το 1879 από τον Walter Flemming. Όπως είναι ξεκάθαρο, ήδη από τον 19^ο αιώνα η βιολογική μελέτη είχε εστιαστεί στην μελέτη του υπο-κυττάρου (sub-cellular) χώρου.

Ο 20^{ος} αιώνας, τώρα, έχει να επιδείξει σημαντικές εξελίξεις στο χώρο της Βιολογίας οι οποίες σε καμία περίπτωση δεν μπορούν να συμπυκνωθούν σε ένα εισαγωγικό κείμενο, όπως το παρόν. Ωστόσο επιχειρείται να δοθούν οι κυριότερες από αυτές. Το 1902, ο Βρετανός φυσιολόγος Archibald Garrod, υποστήριξε ότι η ασθένεια Αλκαπτονουρία (alkaptonuria) κληρονομείται και μάλιστα η κληρονομικότητα αυτή ακολουθεί τους νόμους του Mendel. Η συγκεκριμένη ασθένεια ήταν από τις πρώτες που περιγράφηκε να έχει γενετικής φύσεως αιτίες (κάτι που επιβεβαιώθηκε πλήρως την δεκαετία του 1990). Την ίδια χρονιά επίσης ο Walter Sutton, διαπίστωσε ότι κατά την μείωση, τα προκύπτοντα κύτταρα (σπερματοζωάρια και ωάρια) λαμβάνουν μόνο

αντίγραφο του κάθε τύπου χρωμοσώματος, ενώ το πρότυπο διαχωρισμού αυτών βρέθηκε να συμφωνεί με τα αντίστοιχα πρότυπα του Mendel. Εξέχουσας σημασίας συμπέρασμα εξήχθη το 1911 από τον Thomas Hunt Morgan και την ομάδα του, οι οποίοι απέδειξαν ότι τα γονίδια, τα οποία αποτελούν τμήματα των χρωμοσωμάτων, είναι οι υπεύθυνες μονάδες για την κληρονομικότητα, ορίζοντας πλέον την σύγχρονη βάση της γενετικής (για την οποία το 1933 τιμήθηκε με το βραβείο Nobel).

Περνώντας στη δεκαετία του 1940, τα δύο σημαντικότερα βιολογικά ευρήματα έχουν να κάνουν πρώτον με την πρώτη απεικόνιση του DNA, το 1943, μέσω X-Ray από τον William Astbury και με την ανακάλυψη της Barbara McClintock το 1944 ότι τα γονίδια μπορούν να τροποποιήσουν τη θέση τους στα χρωμοσώματα, αποδεικνύοντας τη δυναμική φύση του γονιδιώματος.

Η δεκαετία του 1950 ήταν περίοδος με ραγδαίες εξελίξεις. Το 1953 οι Francis Crick και James Watson περιέγραψαν την δομή του DNA ως διπλή έλικα ανοίγοντας νέους δρόμους στη βιολογική έρευνα ενώ το 1955 ο Joe Hin Tjio απέδειξε τον ακριβή αριθμό των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων, που είναι 46. Την ίδια χρονιά ο Arthur Kornberg και η ομάδα του κατάφεραν να απομονώσουν την DNA πολυμεράση, ένα ένζυμο που κατέχει κεντρικό ρόλο στην αντιγραφή του DNA και είναι απαραίτητο για την επιτυχή δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA αλλά και την αποκωδικοποίηση του γονιδιώματος.

Περνώντας στη δεκαετία του 1960, το 1961 οι Sydney Brenner, Francois Jacob, και Matthew Meselson ανακάλυψαν ότι το mRNA είναι το μόριο που μεταφέρει την πληροφορία που βρίσκεται στο DNA από τον πυρήνα στους μηχανισμούς παραγωγής πρωτεϊνών ενώ το 1966 ο μηχανισμός της μετάφρασης του αλφαβήτου των 4 γραμμάτων των DNA-RNA στα 20 διαφορετικά αμινοξέα ανακαλύφθηκε από τους Marshall Nirenberg, Har Khorana και Severo Ochoa.

Η δεκαετία του 1970, μεταξύ άλλων είχε να επιδείξει δύο ιδιαίτερα σημαντικά επιτεύγματα. Τις χρονιές 1975 και 1977 ο Sanger και οι συνεργάτες του αλλά και οι Maxam και Gilbert εξέλιξαν μεθόδους αποδοτικής και ταχείας αλληλούχισης του DNA. Επίσης το 1977 στα εργαστήρια των Richard Roberts και Phil Sharp ανακαλύφθηκε η ύπαρξη των εσονίων στα γονίδια των ευκαρυωτικών οργανισμών, δηλαδή των περιοχών των γονιδίων που δεν συμμετέχουν στον σχηματισμό πρωτεϊνών και αποκόπτονται κατά τη διαδικασία της μεταγραφής.

Περνώντας στην δεκαετία 1980, συνέβησαν κομβικές εξελίξεις που καθόρισαν τις μεθόδους βιοτεχνολογίας των επομένων ετών αλλά και εισήγαγαν τη χρήση των υπολογιστών και της επιστήμης της Πληροφορικής ως όλο και περισσότερο αναγκαίο εργαλείο για την διαχείρισης της πολυπλοκότητας των βιολογικών προβλημάτων. Το 1981-82 επετεύχθη η δημιουργία των πρώτων διαγονιδιακών θηλαστικών (ποντίκι) και εντόμων (μύγα), εξέλιξη η οποία άλλαξε σε πολύ μεγάλο βαθμό την βιολογική έρευνα. Το 1982, δημιουργήθηκε για πρώτη φορά μία βάση δεδομένων με δεδομένα ακολουθίας DNA, η GenBank, στην οποία κατατίθεντο ακολουθίες από διάφορους μηχανισμούς. Έτσι, ξεκίνησε η συμβολή της πληροφορικής στη διαχείριση της βιολογικής πληροφορίας η οποία επέτρεψε την διαχείρισή της και την εξαγωγή γνώσης από αυτή. Το 1983, προετοιμάστηκε το έδαφος για την ιδιαίτερα συνηθισμένη στις μέρες

μας συσχέτιση ασθενειών με γονίδια, με την πρώτη σύνδεση της ασθένειας Huntington με γενετικό βιοδείκτη στο χρωμόσωμα 4. Την ίδια χρονιά ανακαλύφθηκε η τεχνική PCR (Polymerase Chain Reaction) [6], η οποία επιτρέπει την δημιουργία πολλαπλών αντιγράφων ενός τμήματος DNA, κάτι που άλλαξε ριζικά την βιοτεχνολογική έρευνα. Συνεχίζοντας, το 1986, εντοπίστηκε το πρώτο γονίδιο με τη χρήση της μεθόδου Κλωνοποίηση Θέσης (Positional cloning) [7], μέσω της οποίας μπορεί να εντοπιστεί ένα γονίδιο χωρίς καμία γνώση για την πρωτεΐνη που αυτό κωδικοποιεί. Η συγκεκριμένη διαδικασία, άλλαξε πλήρως μετά την αποκωδικοποίηση του DNA και πλέον πραγματοποιείται απευθείας στα διαθέσιμα δεδομένα των βάσεων δεδομένων. Τέλος, την χρονιά 1987, δημιουργήθηκε ο πρώτος Γενετικός Χάρτης του ανθρώπου [8], αναδεικνύοντας τις περιοχές των χρωμοσωμάτων που έχουν την τάση να κληρονομούνται μαζί.

Από την δεκαετία του 1990 και εντεύθεν, παρουσιάστηκαν καταγιστικές εξελίξεις στην βιολογική και βιοτεχνολογική έρευνα οι οποίες λίγο έως πολύ καθορίστηκαν από την έναρξη του Προγράμματος Αποκωδικοποίησης του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project) το 1990. Οι κεντρικοί στόχοι του προγράμματος ήταν η επιτυχής ανάγνωση των 3,2 δισεκατομμυρίων βάσεων στο DNA και η κατάλληλη χαρτογράφηση του ανθρώπινου γονιδιώματος. Μαζί με αυτούς τους πρωτεύοντες στόχους, τέθηκαν οι επίσης σημαντικοί και αναγκαίοι στόχοι, της ανάπτυξης της κατάλληλης τεχνολογίας για την ανάλυση του DNA αλλά και η μελέτη των ηθικών, νομικών και κοινωνικών ζητημάτων που αφορούν την γενωμική έρευνα. Στα επόμενα χρόνια υπήρξαν συνεχείς παρουσιάσεις ανάγνωσης γονιδιωμάτων ολόκληρων οργανισμών αλλά και συνεχής βελτίωση των γενετικών χαρτών του ανθρώπου. Σημαντική στιγμή για την αναγκαία συνεργασία της Πληροφορικής και της Βιολογίας-Βιοτεχνολογίας, αποτελεί ο καθορισμός των βασικών οδηγιών για την κατάλληλη αποθήκευση και δημοσίευση των αποτελεσμάτων αποκωδικοποίησης του DNA κατά το Human Genome Project, το 1997, ανοίγοντας έτσι το δρόμο για το πολύτιμο εργαλείο των βάσεων δεδομένων με βιολογική-γενωμική πληροφορία η οποία το 2000 αποφασίστηκε να παραμείνει ελεύθερη προς πρόσβαση για τον οποιοδήποτε..

Ιδιαίτερα σημαντική στιγμή για την νέα εποχή της γενωμικής, αποτέλεσε η αποδοχή το 2001 από τον FDA (Food and Drug Administration), φαρμάκου που βασιζόμενο σε γενετική πληροφορία μπορεί να στοχεύει μόνο τα καρκινικά κύτταρα στην χρόνια μυελώδη λευχαιμία, ενώ το 2002 ανακαλύφθηκε γενετική συσχέτιση για τον καρκίνο του προστάτη.

Με την ολοκλήρωση του Human Genome Project το 2003, πλέον στα χέρια της επιστημονικής κοινότητας διατίθετο μία άνευ προηγουμένου πληθώρα πληροφοριών, σε συνδυασμό με όλα τα ευρήματα των περασμένων δεκαετιών. Ωστόσο, η ποσότητα της πληροφορία αυτή απαιτήσε και απαιτεί κατάλληλες μεθόδους διαχείρισης, επεξεργασίας και ανάλυσής της. Έτσι στα χρόνια που ακολούθησαν την ολοκλήρωση του Human Genome Project η εφαρμογή μεθόδων Πληροφορικής στον χώρο της Βιολογίας, γιγαντώθηκε και αποτέλεσε αναγκαιότητα για την αξιοποίηση της διαθέσιμης πληροφορίας,. Η συμβολή της Πληροφορικής στην μελέτη της Βιολογίας και των

φαινομένων που συμβαίνουν σε αυτή αναλύεται στις ακόλουθες ενότητες αλλά και στο σύνολο της παρούσας εργασίας.

1.2 Η συμβολή της Πληροφορικής στην αποκωδικοποίηση και στην ανάλυση του γονιδιώματος. Η γέννηση της Βιοπληροφορικής

Η αποκωδικοποίηση ενός γονιδιώματος, όπως του ανθρώπινου που έγινε μέσω του Human Genome Project, όπως είναι αναμενόμενο, είναι μία ιδιαίτερα σύνθετη και δύσκολη διαδικασία η οποία απαιτεί σημαντικές προσπάθειες, όχι μόνο στην ανάγνωση της ακολουθίας των βάσεων αλλά και στη μετέπειτα ανάλυση αυτών. Πέραν του κεντρικού ρόλου που έπαιξε η εξέλιξη της βιοτεχνολογίας στον δρόμο προς την επίτευξη του παραπάνω στόχου, η επιστήμη που θα μπορούσε να συμβάλει αποφασιστικά ήταν η αυτή της Πληροφορικής έχοντας ήδη αναπτύξει μεθόδους διαχείρισης και ανάλυσης δεδομένων αλλά και εξαγωγής γνώσης και πληροφορίας από διάφορου είδους σήματα όπως οι εικόνες και πολλά άλλα ήδη μετρήσεων. Έτσι, ταυτόχρονα με την επανάσταση της γενωμικής, γεννήθηκε ο επιστημονικός τομέας της Βιοπληροφορικής (Bioinformatics) [9].

Ένας από τους πρώτους και βασικούς ρόλους των μεθόδων Βιοπληροφορικής στην επίτευξη του στόχου της αποκωδικοποίησης του γονιδιώματος, ήταν η κατάλληλη διαχείριση του σήματος που εξάγεται από τις διάφορες βιοτεχνολογικές μεθόδους που έχουν ως στόχο την ανάγνωση της ακολουθίας του DNA (όπως περιγράφονται στην [10]). Χωρίς την συμβολή των μεθόδων Πληροφορικής, θα ήταν αδύνατο όλη αυτή η τεράστια σε ποσότητα και πολυπλοκότητα πληροφορία να διαχειριστεί και να εξαχθεί η ζητούμενη γνώση από αυτή. Ωστόσο, η Βιοπληροφορική έπαιξε ακόμα σημαντικότερο ρόλο στην εξακρίβωση του περιεχομένου της αναγνωσμένης πληροφορίας. Ένας σύντομος ορισμός για τον επιστημονικό τομέα της Βιοπληροφορικής μπορεί να δοθεί ως ακολούθως:

Η Βιοπληροφορική είναι ο επιστημονικός τομέας εκείνος ο οποίος έχει ως κύριο στόχο την αξιοποίηση υπαρχόντων και την ανάπτυξη νέων μεθόδων Πληροφορικής, με στόχο την εξαγωγή, την διαχείριση και την ανάλυση Βιολογικής Πληροφορίας.

Ορισμός 1.1

Οι κυριότερες περιοχές της Πληροφορικής οι οποίες συνέβαλλαν και συμβάλουν στην δημιουργία των μεθόδων Βιοπληροφορικής είναι αυτές της Αναγνώρισης Προτύπων (Pattern Recognition) [11], της Εξαγωγής Γνώση από Δεδομένα (Data Mining) [12], της Μηχανικής Μάθησης (Machine Learning) [13] και της Οπτικοποίησης [14] Δεδομένων (Visualization). Ωστόσο, σημαντική είναι και η συνεισφορά άλλων τομέων όπως των γλωσσών προγραμματισμού (με αρκετές γλώσσες να αναπτύσσονται σχεδόν κατά αποκλειστικότητα για την Βιοπληροφορική Ανάλυση), των βάσεων δεδομένων (για την αποθήκευση δεδομένων και αναλύσεων αυτών), της ασφάλειας (για την ασφαλή φύλαξη και μεταφορά των δεδομένων) και πολλές άλλες.

Οι σημαντικότερες μέθοδοι Βιοπληροφορικής οι οποίες συνέβαλαν σημαντικά στην ολοκλήρωση του Human Genome Project και συνεχίζουν να υποστηρίζουν την βιολογική έρευνα συνοψίζονται ακολούθως:

- **Διάταξη Γονιδιώματος (Genome Assembly)** [15]: Συνδυασμός μικρών ακολουθιών DNA ώστε να ανασυντεθεί η σειρά με την οποία βρίσκονται στα χρωμοσώματα από τα οποία και προέρχονται.
- **Στοίχιση ακολουθιών (Sequence Alignment)** [16]: Κατάλληλη διάταξη δύο ή περισσότερων ακολουθιών DNA, RNA ή αμινοξέων πρωτεΐνης ώστε να εντοπιστούν περιοχές ομοιότητας που μπορεί να οφείλονται σε λειτουργικές, δομικές ή εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των ακολουθιών.
- **Χαρακτηρισμός Γονιδιώματος (Genome Annotation)** [17]: Εύρεση των περιοχών στο DNA που αποτελούν γονίδια ή έχουν άλλα βιολογικά χαρακτηριστικά.
- **Στοίχιση Δομών Πρωτεϊνών (Protein Structure Alignment)** [18]: Εύρεση πιθανής ομολογίας μεταξύ πρωτεϊνών και RNA πραγματοποιώντας συγκρίσεις σε επίπεδο τρισδιάστατης δομής και όχι σε επίπεδο ακολουθίας αμινοξέων.
- **Πρόβλεψη Δομών Πρωτεϊνών (Protein Structure Prediction)** [19]: Πρόβλεψη της τρισδιάστατης δομής μίας πρωτεΐνης μέσω της ακολουθίας των αμινοξέων από τα οποία απαρτίζεται.
- Μέτρηση, Ανάλυση και Πρόβλεψη της έκφρασης γονιδίων (Gene Expression Measure, Analysis and Prediction)
- **Ανάλυση των ρυθμιστικών λειτουργιών** [20]: Ανάλυση όλων εικόνων των φαινομένων που μπορούν να οδηγήσουν στην ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων σε ένα κύτταρο. Παράδειγμα αποτελεί η ανάλυση υποκινητών, δηλαδή ο εντοπισμός μοτίβων ακολουθιών στην γειτονική περιοχή των γονιδίων που ρυθμίζουν την έκφραση αυτού.
- **Εύρεση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ Πρωτεϊνών (Protein-Protein Interactions)** [21]: Εντοπισμός των πρωτεϊνών που πρέπει να δημιουργήσουν σύμπλοκο μεταξύ τους ώστε να πραγματοποιήσουν τη βιολογική τους λειτουργία.
- **Μελέτες Συσχέτισης σε κλίμακα Γονιδιώματος (Genome Wide association studies)** [22]: Μελέτη του γονιδιώματος διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους με στόχο την εξακρίβωση των μεταξύ τους διαφορών αλλά και τη συσχέτιση αυτών με διάφορα γνωρίσματα, όπως οι ασθένειες.

Μέσω των παραπάνω μεθόδων, οι οποίες αποτελούν ένα υποσύνολο των μεθόδων Βιοπληροφορικής, τις τελευταίες δύο δεκαετίες αποκαλύφθηκαν πολλές ιδιότητες του γονιδιώματος αλλά και γενικότερα της βιολογίας με τον εντοπισμό διαφόρων βιομορίων. Ωστόσο, οι μορφές αναλύσεων που περιγράφηκαν αλλά και τα δεδομένα που χρησιμοποιούν αυτές, δεν παύουν να αποτελούν στιγμιότυπα των μελετώμενων βιολογικών διεργασιών οι οποίες είναι δυναμικές διαδικασίες. Επίσης σε πολλές περιπτώσεις, οι αποκτούμενες πληροφορίες έχουν αποσπασματικό χαρακτήρα και δεν είναι συσχετισμένες με άλλες βιολογικές διεργασίες και τα σχετικά εμπλεκόμενα

βιομόρια. Έτσι, διαμορφώθηκε και συνεχίζει να υφίσταται η ανάγκη ανάπτυξης μεθοδολογιών που θα επιτρέπουν την μελέτη των βιολογικών διαδικασιών κατά την δυναμική τους εξέλιξη στο χρόνο αλλά και θα συνδυάζουν όλες τις διαθέσιμες πληροφορίες. Για την κάλυψη της ανάγκης αυτής, διαμορφώθηκε και συνεχώς εξελίσσεται, ο επιστημονικός χώρος της Συστημικής Βιολογίας (Systems Biology), ο οποίος αποτελεί αντικείμενο των επομένων δύο ενοτήτων αλλά και για το σύνολο της παρούσας εργασίας.

1.3 Από την Βιοπληροφορική στη Συστημική Βιολογία

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, παρά την σημαντική συνεισφορά των Μεθόδων Βιοπληροφορικής στην ανακάλυψη όλων των σημαντικών πληροφοριών που παρουσιάστηκαν προηγουμένως, τα ευρήματα αυτά δεν παύουν να αποτελούν αποσπασματικές πληροφορίες από το σύνολο των βιολογικών συστημάτων. Όπως αναφέρεται στην [23], ο εντοπισμός όλων των γονιδίων, των πρωτεϊνών και των άλλων βιομορίων ενός οργανισμού ισοδυναμεί με την τοποθέτηση σε μία λίστα όλων των εξαρτημάτων ενός μηχανήματος. Παρότι αυτή η λίστα μπορεί να προσφέρει σημαντική πληροφόρηση, δεν είναι αρκετή ώστε να κατανοηθεί σε όλη του την πολυπλοκότητα ο τρόπος λειτουργίας του μηχανήματος και κάτι τέτοιο απαιτεί την γνώση του τρόπου με τον οποίο τα διάφορα εξαρτήματα συνδέονται μεταξύ τους ώστε να δημιουργήσουν την τελική δομή και λειτουργικότητα του μηχανήματος. Κατά ανάλογο τρόπο, η εξαντλητική δημιουργία δομών βιολογικής πληροφορίας, όπως τα δίκτυα ρύθμισης γονιδίων (gene regulatory networks) αλλά και η γνώση των διαφόρων βιοχημικών αλληλεπιδράσεων που συμβαίνουν, δεν είναι αρκετά ώστε να εξαχθεί γνώση για την επιρροή που έχει το ένα τμήμα του συστήματος στο άλλο. Όπως προτείνεται, λοιπόν, στην [23], θα πρέπει η βιολογική έρευνα να κατευθυνθεί προς την κατεύθυνση μελέτης Συστημάτων και η σχετική γνώση για αυτά μπορεί να προκύψει από τους ακόλουθους τομείς:

1. **Δομές Συστημάτων:** Δίκτυα αλληλεπίδρασης γονιδίων και βιοχημικά βιολογικά μονοπάτια, όπως επίσης και οι μηχανισμοί που ορίζουν τις φυσικές ιδιότητες των δομών σε επίπεδο κυττάρου και σε επίπεδο πληθυσμών
2. **Δυναμική Συστημάτων:** Ο τρόπος με τον οποίο ένα σύστημα συμπεριφέρεται στη διάρκεια του χρόνου και σε διαφορετικές συνθήκες.
3. **Έλεγχος:** Μηχανισμοί που ελέγχουν την κατάσταση του κυττάρου οι οποίοι μπορούν να τροποποιηθούν ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι δυσλειτουργίες και να προκύψουν πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι .
4. **Σχεδιασμός:** Μέθοδοι τροποποίησης και δημιουργίας βιολογικών συστημάτων, που διαθέτουν επιθυμητές ιδιότητες. Τα συγκεκριμένα συστήματα μπορούν να βασιστούν σε καθορισμένες αρχές σχεδιασμού και σε προσομοιώσεις, αποφεύγοντας τη διαδικασία δοκιμής και απόρριψης (trial and error)

Η ανάγκη, λοιπόν, της μελέτης της βιολογίας σε επίπεδο δυναμικών συστημάτων, οδήγησε στην δημιουργία του χώρου της Συστημικής Βιολογίας. Αν και οι προτεινόμενες από αυτόν τον χώρο προσεγγίσεις αποτελούν κεντρικό ζήτημα της παρούσας εργασίας,

στην ακόλουθη ενότητα δίνονται εν συντομία οι βασικές αρχές που τον διέπουν, ενώ στα ακόλουθα Κεφάλαια, δίνονται οι λεπτομέρειες για την πρακτική εφαρμογή των προτεινόμενων προσεγγίσεων.

1.4 Συστημική Βιολογία

Όπως, λοιπόν, σκιαγραφήθηκε στην προηγούμενη ενότητα, η Συστημική Βιολογία αποτελεί και προβλέπεται να αποτελέσει ακόμα περισσότερο στο μέλλον, μία νέα εποχή στην Βιολογική Έρευνα. Αν και ο συγκεκριμένος χώρος συνεχίζει να εξελίσσεται και να προτείνει νέες μεθόδους για την ανάλυση και την απόκτηση βιολογικής γνώσης, μπορούν να του αποδοθούν κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά.

Η Συστημική Βιολογία, αποτελεί τον επιστημονικό χώρο που έχει ως στόχο την αξιοποίηση:

- της συνεχούς αυξανόμενης ποιοτικής αλλά και ποσοτικής βιολογικής γνώσης,
- της πληθώρας –ομικών (γενωμικών, πρωτεωμικών, μεταβολομικών κ.ο.κ.) δεδομένων που παράγονται στις μέρες μας μέσω των ανεπτυγμένων μεθόδων βιοτεχνολογίας
- των ανεπτυγμένων μαθηματικών-πληροφορικών μεθόδων που εφαρμόζονται στα –ομικά δεδομένα (μέθοδοι Βιοπληροφορικής)

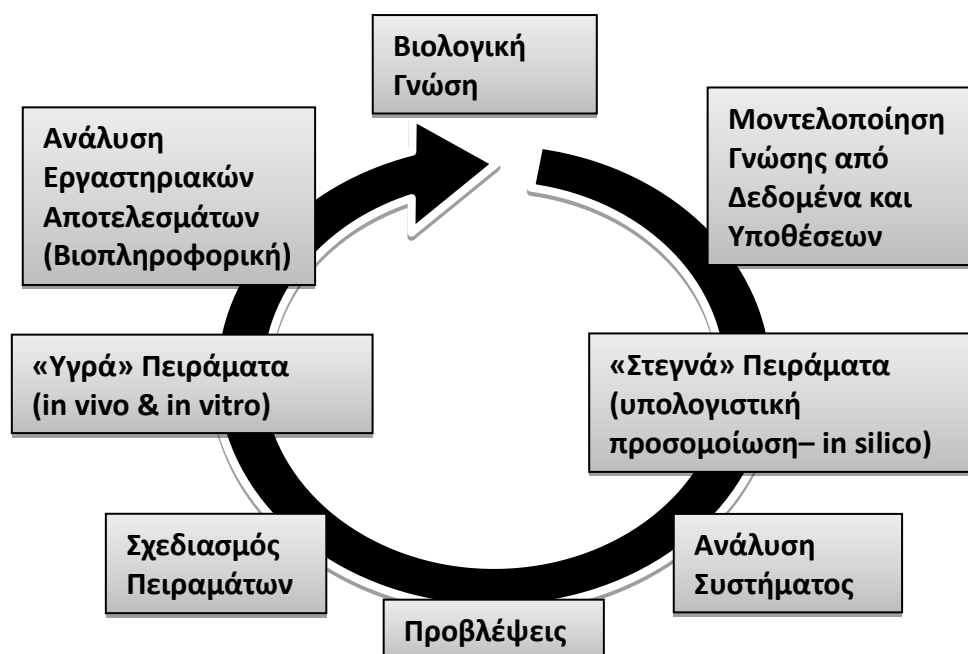
με στόχο:

- τον συνδυασμό σε κοινές δομές γνώσεις (συστήματα/μοντέλα) των παραπάνω γνώσεων
- την αποχώρηση από τη μελέτη συγκεκριμένων βιομορίων ή την μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ συγκεκριμένων μόνο βιομορίων
- τον ορισμό ολιστικών μοντέλων για τις διάφορες βιολογικές-βιοχημικές διαδικασίες-φαινόμενα που συμβαίνουν φυσιολογικώς ή κατά την κατάσταση ασθένειας στο επίπεδο εντός του κυττάρου αλλά κα στο επίπεδο πληθυσμών κυττάρων
- την υποστήριξη της βιολογικής έρευνας μέσω της δημιουργίας προβλέψεων για την δυναμική συμπεριφορά των βιολογικών συστημάτων στο χρόνο αλλά και κατά την τροποποίηση των συνθηκών που βρίσκονται αυτά ή την αλλαγή συγκεκριμένων παραμέτρων-χαρακτηριστικών τους.

Η Συστημική Βιολογία, βασίζεται στις Υπολογιστικές Μεθόδους έτσι ώστε να είναι εφικτή η διαχείριση της πολύ μεγάλης διαθέσιμης πληροφορίας αλλά και η υψηλή πολυπλοκότητα των βιολογικών συστημάτων. Επίσης, η Συστημική Βιολογία, πολλές φορές καλείται και Υπολογιστική Βιολογία ή και Εκτελέσιμη (Executable) Βιολογία δεδομένου ότι στα πλαίσια της δημιουργούνται μοντέλα των βιολογικών διαδικασιών-φαινομένων που μπορούν να προσομοιωθούν υπολογιστικά. Επίσης δίνεται η

δυνατότητα επέμβασης στις διαδικασίες αυτές τροποποιώντας κατάλληλα την δομή και τις παραμέτρους των δημιουργηθέντων μοντέλων.

Η γενικότερη φιλοσοφία και ο τρόπος με τον οποίο η Συστημική Βιολογία επιχειρεί να αποτελέσει σημαντικό κλάδο της βιολογικής έρευνας μπορεί να δοθεί από το ακόλουθο σχήμα, στο οποίο εμφανίζονται τα βήματα κατά τα οποία μπορεί να συμβάλει αλλά και να ορίσει η Συστημική Βιολογία



Σχήμα 1.1 Ο κύκλος της Συστημικής Βιολογίας [23]

Λεπτομέρειες για τα παραπάνω αναφερόμενα βήματα δίνονται στα ακόλουθα κεφάλαια της εργασίας, ενώ παράδειγμα χρήσης της Συστημικής Βιολογίας αποτελεί το σύνολο της παρούσας εργασίας.

1.5 Συστημική Βιολογία και Νόσος του Πάρκινσον. Στόχοι, Συνεισφορά και Διάρθρωση της Εργασίας

Τα τελευταία χρόνια, έχουν παρουσιαστεί στη διεθνή βιβλιογραφία πολύ σημαντικά ευρήματα σχετικά με την ανάπτυξη της Νόσου του Πάρκινσον (ΝτΠ). Τα ευρήματα αυτά αναφέρονται και σε συσχετίσεις γενετικού επιπέδου αλλά και σε διάφορους μοριακούς μηχανισμούς που συμμετέχουν στην εμφάνιση και στην ανάπτυξη της Νόσου. Οι κυριότερες προσπάθειες εντοπίζονται στην μελέτη της σχέσης της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνης με την Νόσο, η οποία πρωτεΐνη έχει συσχετιστεί γενετικά με αυτή. Επίσης έχει βρεθεί ότι η υπερ-έκφρασή της ή η έκφρασή της κατόπιν μετάλλαξης, ευθύνεται σε σημαντικό βαθμό για τον παρατηρούμενο νευροεκφυλισμό με κεντρικά φαινόμενα την δημιουργία ολιγομερών της πρωτεΐνης αλλά και την καταπίεση διαφόρων πρωτεολυτικών μηχανισμών του κυττάρου.

Παρόλη την σημαντική πρόοδο στην κατανόηση του ρόλου της α-συνουκλεΐνης στην ΝτΠ, πολλά ερωτήματα παραμένουν αναπάντητα. Σημαντική υποστήριξη στην διαλεύκανση των ζητημάτων αυτών μπορεί να δοθεί από εφαρμογές των μεθόδων

Συστημικής Βιολογίας. Έτσι ως γενικότερος στόχος της παρούσας εργασίας τέθηκε η πραγματοποίηση των πρώτων βημάτων στην δημιουργία ενός μοντέλου Συστημικής Βιολογίας, που θα είναι ικανό να συνδράμει στην περαιτέρω κατανόηση στον σχετικών με την α-συνουκλεΐνη φαινομένων. Ειδικότερα, όπως θα περιγραφεί με λεπτομέρεια στην συνέχεια της εργασίας, τέθηκε ο στόχος, κατά την πρώτη φάση ανάπτυξης του μοντέλου, αυτό να μπορεί να προσομοιώνει την δυναμική συμπεριφορά του βιολογικού συστήματος κατά την υπερ-έκφραση της α-συνουκλεΐνης, τον ολιγομερισμό αυτής αλλά και την αλληλεπίδραση (αποδόμηση και καταπίεση) αυτής με τους διάφορους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς που είναι γνωστό πως αλληλεπιδρά. Για την επίτευξη των στόχων αυτών, ήταν απαραίτητη η μελέτη ενός μεγάλου φάσματος της σχετικής με την Συστημικής Βιολογία, βιβλιογραφίας η οποία οδήγησε στην απόκτηση σημαντικής γνώσης επί των διαφόρων μεθόδων, η οποία και παρουσιάζεται στην παρούσα εργασία.

Η δημιουργία ενός τέτοιου μοντέλου μπορεί να αποτελέσει βάση για την ανάπτυξη εργαλείων, ικανών να συμβάλουν στην κατανόηση των παρατηρούμενων φαινομένων αλλά και να καθοδηγήσουν την περαιτέρω αναγκαία έρευνα μέσω της δοκιμής υποθέσεων. Το προτεινόμενο από την εργασία μοντέλο, είναι ικανό να προσομοιώσει σημαντικά φαινόμενα σχετικά με την υπερ-έκφραση της α-συνουκλεΐνης, ενώ είναι ικανό να προβλέψει ορθά την συμπεριφορά του συστήματος όταν έχουν συμβεί διάφορες εργαστηριακές παρεμβάσεις σε αυτό. Έτσι, αποτελεί ένα σημαντικό πρώτο βήμα στην ανάπτυξη των εν λόγω εργαλείων και στην αξιοποίηση των μεθόδων Συστημικής Βιολογίας στην έρευνα για τη Νόσο του Πάρκινσον.

Όσον αφορά την διάρθρωση της εργασίας, στο 2^ο Κεφάλαιο, παρουσιάζονται με λεπτομέρεια οι αρχές της Συστημικής Βιολογίας, ο δημοφιλέστερος φορμαλισμός ορισμού μοντέλων, αυτός των Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων αλλά και οι κυριότερες υπολογιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στην δημιουργία και στην αξιοποίηση των μοντέλων Συστημικής Βιολογίας. Στο 3^ο Κεφάλαιο παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά της ΝτΠ, ενώ επίσης γίνεται μία ευρεία ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τα εργαστηριακά ευρήματα που αφορούν την α-συνουκλεΐνης και που συνδέουν την υπερ-έκφραση της με τη ΝτΠ. Τα ευρήματα αυτά αποτέλεσαν την βάση για την δημιουργία του προτεινόμενου μοντέλου. Στο 4^ο Κεφάλαιο, παρουσιάζεται το προτεινόμενο μοντέλο ενώ επίσης δίνεται ο μαθηματικός ορισμός του αλλά και περιγράφεται η διαδικασία εκπαίδευσής του μέσω των διαθέσιμων εργαστηριακών δεδομένων. Στο 5^ο Κεφάλαιο, δίνονται τα αποτελέσματα προσομοίωσης του μοντέλου και για τις συνθήκες για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα αλλά και για διάφορες άλλες συνθήκες για τις οποίες δίνονται προβλέψεις που επιβεβαιώνονται μέσω εργαστηριακών ευρημάτων. Η εργασία ολοκληρώνεται με το 6^ο Συμπερασματικό Κεφάλαιο

.

2. ΣΥΣΤΗΜΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΔΙΚΤΥΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Όπως παρουσιάστηκε και στην Ενότητα 1.4, κατά την τελευταία δεκαετία στην οποία αναπτύχθηκε ουσιαστικά ο χώρος της Συστημικής Βιολογίας, έχει προταθεί μία πληθώρα τρόπων Μοντελοποίησης των υπό μελέτη Βιολογικών Συστημάτων και αναπαράστασης των μοντέλων αυτών. Ωστόσο, όσο η πρόσβαση σε λεπτομερή δεδομένα σε μοριακό/βιοχημικό επίπεδο, γίνεται ευκολότερη και κυρίως οικονομικότερη, η κατηγορία των μοντέλων που σταδιακά επικρατεί των άλλων είναι αυτή των Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων. Το σημαντικό πλεονέκτημα των συγκεκριμένων δικτύων είναι ότι βασικό εργαλείο μοντελοποίησης σε αυτά αποτελούν οι Βιοχημικές Αντιδράσεις (χημικές αντιδράσεις που συμβαίνουν στα κύτταρα των ζώντων οργανισμών), Έτσι, η μοντελοποίηση των βιολογικών συστημάτων γίνεται με όρους ιδιαίτερα κοντά στους φυσικούς/χημικούς νόμους που διέπουν το σύστημα, σε αντίθεση με τις έννοιες της Καταπίεσης ή της Ενεργοποίησης οι οποίες αποτελούν υψηλότερου επιπέδου περιγραφές της δυναμικής του συστήματος και συναντώνται στα δίκτυα Αλληλεπιδράσεων. Ένα ακόμα πλεονέκτημα των Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων είναι ότι οι βασικές αρχές μοντελοποίησης που ορίζονται από αυτά, μπορούν να γίνουν εύκολα αντιληπτές από ένα ευρύ φάσμα επιστημόνων συμπεριλαμβανομένων των βιοχημικών, των φυσικών, των βιολόγων αλλά και των επιστημόνων πληροφορικής.

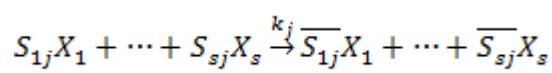
Στις ακόλουθες ενότητες παρουσιάζεται το θεωρητικό πλαίσιο το οποίο διέπει τα συγκεκριμένα δίκτυα (η παρουσίαση βασίζεται στην αντίστοιχη παρουσίαση που δίνεται στην [24]) ενώ παρουσιάζονται οι κυριότερες μέθοδοι προσομοίωσης, ανάλυσης και εκπαίδευσης τους.

2.1 Θεωρητικό Πλαίσιο Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων

Για την παρουσίαση του θεωρητικού πλαισίου των Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων, θεωρούμε τα μόρια από S διαφορετικές χημικές οντότητες (chemical species), τα οποία είναι ομοιογενώς κατανεμημένα σε μία περιοχή/διαμέρισμα σταθερού όγκου V . Επίσης θεωρούμε ότι το συγκεκριμένο σύστημα βρίσκεται σε θερμική ισορροπία ενώ τα διάφορα μόρια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω κάποιων r μη αναστρέψιμων/μονής κατεύθυνσης καναλιών αντιδράσεων (reaction channels).

Ένα κανάλι αντίδρασης καλείται στοιχειώδες (elementary) όταν μέσω αυτού πραγματοποιείται ένα απλό βήμα, ωστόσο μπορεί να αναπαριστά το σύνολο ενός αριθμού θεμελιωδών βημάτων σε ένα απλό βήμα. Επίσης, οι αντιστρέψιμες (reversible) αντιδράσεις μπορούν να οριστούν ως δύο μη αντιστρέψιμες αντιδράσεις.

Συμβολίζοντας τώρα την i -οστή οντότητα με X_i και την j -οστή αντίδραση με R_j , το κανάλι αντίδρασης R_j αναπαριστάται από το παρακάτω γενικό σχήμα:



όπου:

- $X_i(t) = \frac{N_i(t)}{\Omega}$, ως μέτρηση των επιπέδων της X_i στο σύστημα την χρονική στιγμή t , με $N_i(t)$ να ορίζεται ως η πολλαπλότητα της συγκεκριμένης οντότητας και Ω να αφορά στο μέγεθος του συστήματος το οποίο:
 - ο Για μοριακές συγκεντρώσεις (molar concentrations) το μέγεθος του συστήματος δίνεται ως $\Omega = N_A V$, όπου N_A ο αριθμός-σταθερά Avogadro [25].
 - ο Για σχετικές συγκεντρώσεις ως Ω τίθεται ένα σταθερός αριθμός.
- S_{ij} , οι στοιχειομετρικοί συντελεστές (stoichiometric coefficients) της αντίδρασης, όπου ο S_{ij} αφορά στη συμμετοχή του X_i ως αντιδρών και ο $\overline{S_{ij}}$, αντιστοίχως ως προϊόν.
- k_j , η σταθερά ρυθμού της αντίδρασης

Η δραστηριότητα του καναλιού αντίδρασης R_j , ποσοτικοποιείται μέσω της μέτρησης της τιμής $Z_j(t)$, του αριθμού των πραγματοποιήσεων της αντίδρασης R_j στο χρονικό διάστημα $[0, t]$.

Εφόσον, τώρα, κάθε πραγματοποίηση της αντίδρασης R_j , αλλάζει την πολλαπλότητα της X_i κατά $S_{ij} = \overline{S_{ij}} - \underline{S_{ij}}$, τότε η συνολική αλλαγή στην πολλαπλότητα της συγκεκριμένης οντότητας στο χρονικό διάστημα $[0, t]$, καθορίζεται από τις στοιχειομετρίες και από τον αριθμό των πραγματοποιήσεων των αντιδράσεων και έτσι δίνεται από:

$$N_i(t) = N_i(0) + \sum_{j=1}^r S_{ij} Z_j(t)$$

Εξίσωση 2.1

και σε μορφή διανύσματος ως

$$N(t) = N(0) + SZ(t)$$

Εξίσωση 2.2

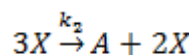
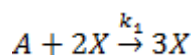
ενώ διαιρώντας με την Ω λαμβάνουμε τη σχέση με όρους συγκεντρώσεων

$$X(t) = X(0) + \frac{SZ(t)}{\Omega}$$

Εξίσωση 2.3

Για την ευκολότερη κατανόηση του παραπάνω πλαισίου, μπορεί να δοθεί ένα απλό παράδειγμα Δικτύου Βιοχημικών Αντιδράσεων. Ένα τέτοιο μοντέλο είναι αυτό του

Schlögl που παρουσιάστηκε στην [26] και περιγράφεται από τις ακόλουθες αντιδράσεις:



Σύστημα Αντιδράσεων 2.1

Δεδομένου, τώρα, ότι ο αριθμός των προτεινόμενων μοντέλων για τα διάφορα βιολογικά συστήματα που μελετώνται και σε υπολογιστικά πλαίσια, αυξάνεται με ραγδαίους ρυθμούς αλλά και ότι υπάρχει η ανάγκη ευκολότερης και αποδοτικότερης δημοσίευσης και ανταλλαγής μοντέλων, δημιουργήθηκε ο στόχος ανάπτυξης οντολογιών και προτύπων περιγραφής αλλά και γραφικής αναπαράστασης των μοντέλων. Όσον αφορά τις οντολογίες, αυτή που πλέον έχει επικρατήσει είναι η SBML (Systems Biology Markup Language) [27, 28, 29] ενώ όσον αφορά τα πρότυπα γραφικής αναπαράστασης έχει επικρατήσει αυτό της SBGN (Systems Biology Graphical Notation) [30].

Η SBML, αποτελεί μία μορφή αναπαράστασης, που βασίζεται στην XML [31], που χρησιμοποιείται για την δημοσίευση και την αποθήκευση υπολογιστικών μοντέλων βιολογικών διαδικασιών. Επίσης, η χρήση της επιτρέπει την ανταλλαγή των μοντέλων αυτών και την επαναχρησιμοποίηση τους μεταξύ των διάφορων εργαλείων που υποστηρίζουν της SBML (τα οποία την περίοδο συγγραφής της εργασίας ξεπερνούσαν τις 200 [29]) χωρίς την ανάγκη μετατροπής αυτών. Μέσω της SBML μπορούν να περιγραφούν διάφορες κλάσεις βιολογικών φαινομένων, συμπεριλαμβανομένων μεταβολικών δικτύων (metabolic networks), βιολογικών μονοπατιών σηματοδότησης (signaling pathways) και ρυθμιστικών δικτύων (regulatory networks).

Μέσω της SBML, κωδικοποιούνται μοντέλα που απαρτίζονται από οντότητα (Species) οι οποίες δρουν μέσω συγκεκριμένων διαδικασιών που ονομάζονται στην γλώσσα της SBML Reactions (αντιδράσεις). Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι η εφαρμογή της SBML δεν περιορίζεται μόνο στα Δίκτυα Βιοχημικών Αντιδράσεων, και παρά την φιλοσοφία της αναπαράστασης διαδικασιών τύπου χημικών αντιδράσεων, ο ίδιος φορμαλισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναπαράσταση πολλών άλλων τύπων διαδικασιών. Επίσης η SBML εμπεριέχει διάφορα άλλα χαρακτηριστικά γλώσσας που επιτρέπουν τον άμεσο ορισμό μαθηματικών εκφράσεων και ασυνεχών γεγονότων, ανεξάρτητων των διαδικασιών αντίδρασης, επιτρέποντας έτσι την περιγραφή πολλών περισσότερων φαινομένων εκτός των βιοχημικών αντιδράσεων. Ακόμα, σημαντικό χαρακτηριστικό της SBML αποτελεί το ότι η αναπαράσταση ενός μοντέλου μέσω αυτής δεν απαιτεί τον ορισμό των μαθηματικών εργαλείων με τα οποία θα περιγραφεί η δυναμική του συστήματος, όπως οι Διαφορικές εξισώσεις ή άλλες μορφές ερμηνείας

(λεπτομέρειες για τον μαθηματικό ορισμό των μοντέλων δίνονται σε ακόλουθες ενότητες). Αυτό το χαρακτηριστικό δίνει σημαντική ευελιξία στις εφαρμογές που υποστηρίζουν την SBML να ορίζουν αυτές τον τρόπο με τον οποίο θα περιγραφεί η δυναμική του συστήματος χωρίς να χρειάζεται να γίνει κάποια σχετική μετατροπή.

Τα βασικά μέρη ενός αρχείου SBML(για τα οποία δεν χρειάζεται να οριστούν κατ' ανάγκη όλα) είναι τα ακόλουθα [29]:

- **Ορισμός Συνάρτησης (Function Definition):** Μία μαθηματική συνάρτηση που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλη την έκταση του μοντέλου
- **Ορισμός Μονάδων (Unit Definition):** Ορισμός νέων μονάδων μέτρησης ή επανορισμός των ενσωματωμένων στην SBML μονάδων. Οι μονάδες αυτές χρησιμεύουν στην αναπαράσταση των ποσοτικών πληροφοριών ενός μοντέλου.
- **Τύπος Διαμερίσματος (Compartment):** Τύπος μιας περιοχής του μοντέλου στην οποία βρίσκονται οι αντιδρούσες οντότητες του συστήματος.
- **Τύπος Οντότητας (Species Type):** Τύπος οντότητας που συμμετέχει στις αντιδράσεις. Συνήθεις τύποι οντοτήτων αποτελούν τα Ιόντα (όπως το ασβέστιο), διάφορα μόρια όπως η γλυκόζη και το ATP, σημεία πρόσδεσης επί των πρωτεϊνών κ.α.
- **Διαμέρισμα (Compartment):** Ομοιογενής διακριτός χώρος του συστήματος, με συγκεκριμένο τύπο και ορισμένο μέγεθος, στον οποίο βρίσκονται διάφορες οντότητες και συμβαίνουν συγκεκριμένες αντιδράσεις. Ένα μοντέλο μπορεί να περιέχει πολλά διαμερίσματα ακόμα και του ίδιου τύπου, ενώ κάθε οντότητα του μοντέλου θα πρέπει να βρίσκεται εντός κάποιου διαμερίσματος.
- **Οντότητες (Species):** Ένα σύνολο οντοτήτων του ίδιου τύπου που βρίσκονται σε συγκεκριμένο διαμέρισμα.
- **Παράμετρος (Parameter):** Μία ποσότητα με ορισμένο όνομα. Στην SBML ο όρος παράμετρος έχει γενική έννοια, χαρακτηρίζοντας ποσότητες άσχετα με τον αν αυτές είναι σταθερές ή μεταβλητές του μοντέλου.
- **Αρχική Ανάθεση (Initial Assignment):** Μαθηματική έκφραση που χρησιμοποιείται για τον ορισμό των αρχικών συνθηκών του μοντέλου. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για τον ορισμό του τρόπου που η τιμή μίας μεταβλητής θα υπολογιστεί από την τιμή άλλων ποσοτήτων του συστήματος στην αρχή της προσομοίωσης.
- **Κανόνας (Rule):** Μαθηματική έκφραση που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τον μαθηματικό ορισμό του μοντέλου (π.χ. διαφορικές εξισώσεις) έτσι ώστε να ορίσουν τον τρόπο που η τιμή μίας μεταβλητής μπορεί να υπολογιστεί από τις τιμές άλλων μεταβλητών. Οι κανόνες μπορούν να συνδυαστούν με τις εξισώσεις κινητικών νόμων των μοντέλων έτσι ώστε να καθορίσουν την συμπεριφορά του μοντέλου στο χρόνο και επηρεάζουν το σύστημα για όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης.

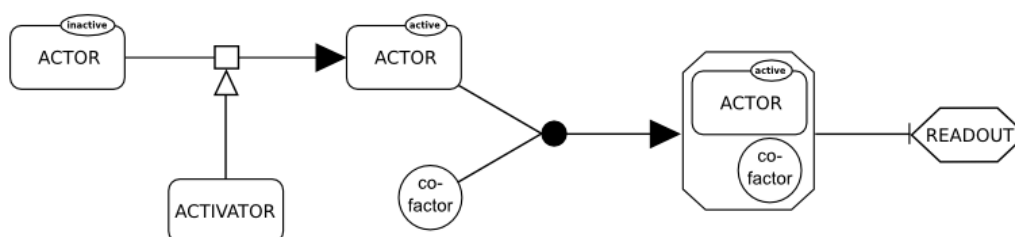
- **Περιορισμός (Constraint):** Μαθηματική έκφραση μέσω της οποίας ορίζονται περιορισμοί για τις τιμές των μεταβλητών του μοντέλου. Οι περιορισμοί αυτοί εφαρμόζονται σε όλη τη διάρκεια της προσομοίωσης, ενώ δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της δυναμικής συμπεριφοράς του συστήματος στο χρόνο.
- **Αντίδραση (Reaction):** Ορισμός που περιγράφει μία τροποποίηση, μετακίνηση ή διαδικασία δέσμευσης μέσω της οποίας μπορούν να αλλάξουν τα επίπεδα μίας ή περισσότερων οντοτήτων.
- **Γεγονός (Event):** Ορισμός που περιγράφει μία στιγμιαία και ασυνεχής αλλαγή σε ένα σύνολο μεταβλητών οποιουδήποτε τύπου (επίπεδα οντοτήτων, μέγεθος διαμερίσματος, τιμές παραμέτρων), η οποία συμβαίνει μόνο όταν μία κατάλληλη συνθήκη πληρείται κατά τη διάρκεια της προσομοίωσης του μοντέλου.

Όσον αφορά την SBGN, τώρα, είναι κοινώς αποδεκτό ότι σημαντικός παράγοντας για την διεύρυνση της αποδοχής των Μοντέλων Συστημικής Βιολογίας, αποτελεί η δυνατότητα οπτικοποίησης αυτών, ώστε να δημιουργούνται αλλά και να δημοσιεύονται ευκολότερα. Ωστόσο, στα πρώτα χρόνια ανάπτυξης του χώρου της Συστημικής Βιολογίας, κάθε εφαρμογή μοντελοποίησης υιοθετούσε, παρότι παραπλήσιους, διαφορετικούς τρόπους γραφικής αναπαράστασης των μοντέλων. Λύση στο συγκεκριμένο πρόβλημα έρχεται να δώσει το αντίστοιχο της SBML πρότυπο όσον αφορά τη γραφική αναπαράσταση, το πρότυπο SBGN.

Μέσω της SBGN ορίζονται συγκεκριμένοι κανόνες για τον τρόπο που πρέπει να δομούνται οι γράφοι των μοντέλων (είτε αποτελούν Δίκτυα Βιοχημικών Αντιδράσεων είτε άλλων μορφών Δίκτυα), τη μορφή που πρέπει να έχουν οι κάθε είδους οντότητες αλλά και ο τρόπος που θα πρέπει να αναπαριστούνται οι διάφορες διαδικασίες.

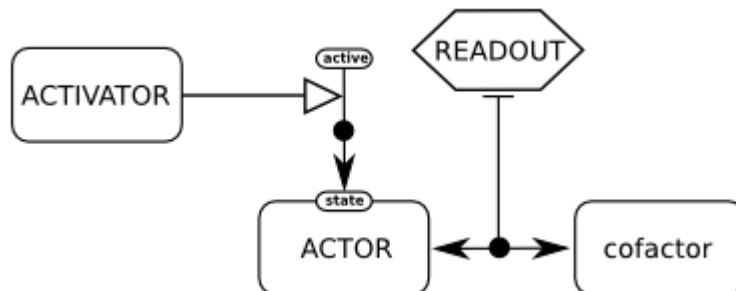
Η SBGN δομείται από τρεις βασικές γλώσσες [32] οι οποίες είναι:

- **SBGN Περιγραφή Διαδικασίας (Process Description)** [33]: Απεικονίζει τη χρονική εξέλιξη των βιοχημικών αλληλεπιδράσεων ή αντιδράσεων στο δίκτυο. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ώστε να εμφανίζει όλες τις αλληλεπιδράσεις/αντιδράσεις μεταξύ των μοριακών οντοτήτων που λαμβάνουν χώρα στο δίκτυο, με την ίδια οντότητα να μπορεί να εμφανίζεται πολλές φορές στο ίδιο διάγραμμα. Ένα παράδειγμα της SBGN Process Description δίνεται στην ακόλουθη εικόνα



Εικόνα 2.1 Παράδειγμα της γλώσσας Περιγραφής Διαδικασίας της SBGN [32]

- **SBGN Σχέση Οντοτήτων (Entity Relationship)** [34]: Επιτρέπει την επισκόπηση των σχέσεων στις οποίες μία οντότητα συμμετέχει, αγνοώντας τη διάσταση του χρόνου. Οι σχέσεις μπορούν να θεωρηθούν ως κανόνες που περιγράφουν την επιρροή των οντοτήτων (κόμβοι του δικτύου) σε άλλες σχέσεις. Οι λογική της SBGN Entity Relationship δίνεται στην ακόλουθη εικόνα.



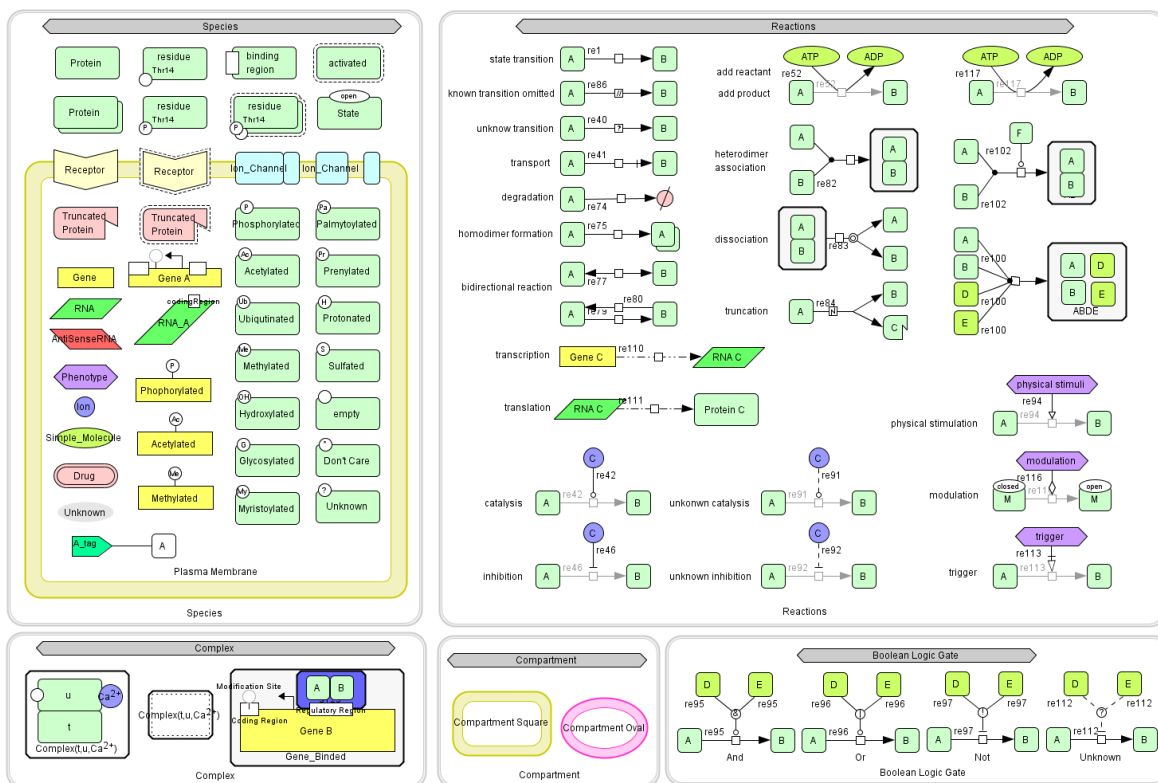
Εικόνα 2.2 Παράδειγμα της γλώσσας Σχέσης Οντοτήτων της SBGN [32]

- **SBGN Ροή Δραστηριότητας (Activity Flow)** [35]: Απεικονίζει την μεταφορά πληροφορίας μεταξύ των βιοχημικών οντοτήτων του δικτύου, αγνοώντας τις αλλαγές κατάστασης αυτών, όπως εμφανίζεται στην ακόλουθη εικόνα.



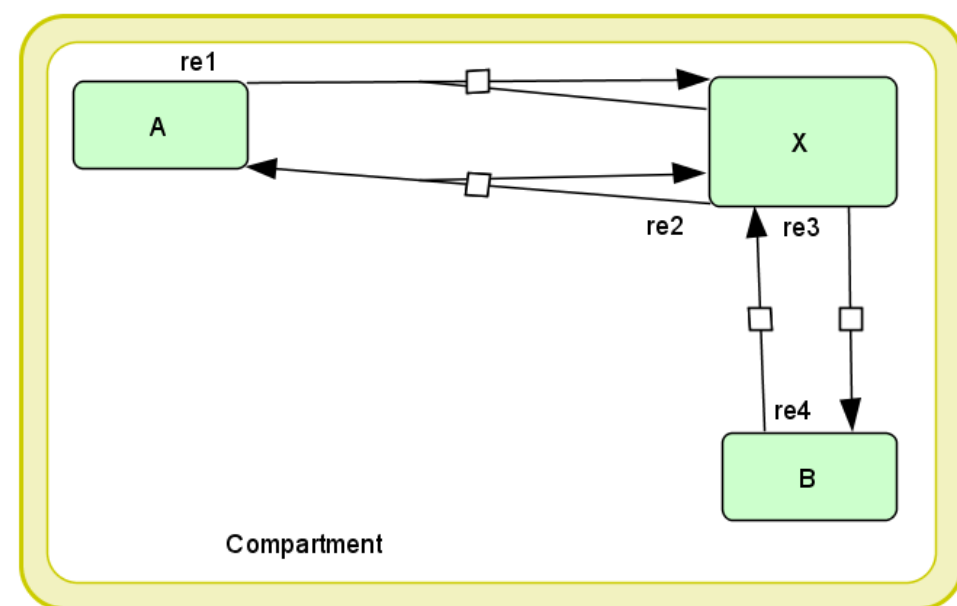
Εικόνα 2.3 Παράδειγμα της γλώσσας Ροής Δραστηριότητας της SBGN [32]

Σημαντικό κομμάτι της SBGN, όπως προαναφέρθηκε, αποτελεί ορισμός της μορφής που πρέπει να παρουσιάζουν οι διάφορες οντότητες αλλά και οι διαδικασίες στις οποίες εμπλέκονται. Ο πλήρης χάρτης των συγκεκριμένων κανόνων δίνεται στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 2.4 Χάρτης των κανόνων της SBGN

Ένα απλό παράδειγμα της χρήσης της SBGN μπορεί να δοθεί για το μοντέλο του Schlögl που παρουσιάστηκε προηγουμένως (σελίδα 37). Η αναπαράσταση του μοντέλου σε SBGN Process Description δίνεται στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 2.5 Αναπαράσταση του Μοντέλου του Schlögl σε SBGN

Οι διάφορες αντιδράσεις που απαρτίζουν το μοντέλο, απεικονίζονται ως βέλη που συνδέουν τις οντότητες, ενώ οι κατεύθυνση του βέλους ορίζει τα αντιδρώντα και τα προϊόντα της αντίδρασης (με το βέλος να δείχνει τα προϊόντα). Θα πρέπει να σημειωθεί ιδιαίτερα, ωστόσο, ότι αναπόσπαστο κομμάτι της δημιουργίας/σχεδίασης οποιουδήποτε μοντέλου αποτελεί ο ορισμός των στοιχειομετρικών συντελεστών κάθε αντίδρασης. Έτσι, μπορεί στην ανωτέρω εικόνα η οντότητα X να εμφανίζεται μία φορά, ωστόσο στη στοιχειομετρία της αντίδρασης $re1$ θα πρέπει να ορίσουμε την συμμετοχή 2 μορίων της X και την απολαβή τελικά 3 μορίων της ίδιας οντότητας. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να εισαχθεί η οντότητα X περισσότερες από μία φορά, όπως σημειώνεται στην περιγραφή της SBGN, ώστε η επιθυμητή στοιχειομετρία να δημιουργηθεί άμεσα. Τέτοιου είδους παραδείγματα θα δοθούν και στο Κεφάλαιο όπου περιγράφεται το μοντέλο που δημιουργήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Έχοντας ορίσει τα παραπάνω, προκύπτει ο στοιχειομετρικός πίνακας του δικτύου, ο οποίος δίνεται ακολούθως.

Πίνακας 2.1 Ο Στοιχειομετρικός πίνακας του Μοντέλου του Schlögl

	(re1)	(re2)	(re3)	(re4)
X	1	-1	-1	1
A	-1	1	0	0
B	0	0	1	-1

Οι παραπάνω ορισμοί, παρότι δοσμένοι σε αυστηρό μαθηματικό πλαίσιο, από μόνοι τους δεν είναι αρκετοί για την υπολογιστική προσομοίωση των Βιοχημικών Συστημάτων που περιγράφονται μέσω αυτών. Τα βασικά στοιχεία τα οποία υπολείπονται για να είναι εφικτό κάτι τέτοιο, είναι ο ορισμός της μεθόδου με την οποία θα αποφασίζεται η

πραγματοποίηση των αντιδράσεων αλλά και ο τρόπος που θα εμπλέκονται οι σταθερές ρυθμών αντίδρασης σε αυτή αλλά και στη συνολική εξέλιξη της προσομοίωσης.

Οι δύο κύριες προσεγγίσεις για την απαιτούμενη αυτή εξειδίκευση είναι η Ντετερμινιστική και η Στοχαστική οι οποίες παρουσιάζονται στην ακόλουθη ενότητα.

2.2 Μέθοδοι Προσομοίωσης Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων

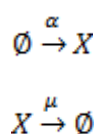
Όπως προαναφέρθηκε, οι δύο κύριες κατηγορίες μεθόδων για την Προσομοίωσης ενός Δικτύου Βιοχημικών αντιδράσεων, είναι η Ντετερμινιστική και η Στοχαστική. Κύριο χαρακτηριστικό της Στοχαστικής προσέγγισης είναι ότι κατά την μοντελοποίηση, θεωρούμε τα διάφορα μόρια ως διακριτές οντότητες (που είναι και στην πραγματικότητα) και ότι οι αντιδράσεις μεταξύ τους πραγματοποιούνται μέσω της συνεύρεσης τους η οποία, όπως ορίζουν οι νόμοι της φυσικής, αποτελεί τυχαία διαδικασία. Απεναντίας στην Ντετερμινιστική προσομοίωση δεν υπάρχει κανένας παράγοντας τυχειότητας. Ανάλογα με την μέθοδο που θα επιλεγεί, απαιτείται και διαφορετική εξειδίκευση των ορισμών που δόθηκαν στην προηγούμενη ενότητα, οι οποίες κύριες μορφές εξειδίκευσης παρουσιάζονται στις υπο-ενότητες της παρούσας ενότητας.

Όσον αφορά την καταλληλότητα εφαρμογής κάθε προσέγγισης ο γενικότερος κανόνας αφορά στα επίπεδα που βρίσκονται οι διάφορες οντότητες του συστήματος. Πιο συγκεκριμένα όπως αναφέρεται στην [36], η Ντετερμινιστική προσέγγιση μπορεί να είναι επαρκής ώστε να προσομοιωθούν συστήματα στα οποία τα επίπεδα των οντοτήτων είναι αρκετά υψηλά (όπως αυτά που παρουσιάζονται στην κλίμακα του δοκιμαστικού σωλήνα). Ωστόσο, όταν τα μελετώμενα συστήματα είναι αρκούντως μικρά ώστε οι μοριακοί πληθυσμοί τουλάχιστον κάποιων από τις εμπλεκόμενες οντότητες να μην είναι ιδιαίτερα μεγαλύτεροι της μονάδος, τότε είναι αναγκαία η Στοχαστική προσέγγιση για την ακριβέστερη προσομοίωση των Συστημάτων αυτών. Επίσης, ένα ιδιαίτερα συνηθισμένος τρόπος διάκρισης της καταλληλότητας εφαρμογής της μία ή της άλλης μεθόδου αφορά στον τύπο της βιολογικής διαδικασίας που μοντελοποιείται. Πιο συγκεκριμένα, η Ντετερμινιστική Προσομοίωση θεωρείται επαρκής για μοντέλα που αφορούν διαδικασία του Μεταβολισμού (Metabolic Networks), στον οποίο συνήθως εμπλέκονται μεγάλοι αριθμοί μορίων. Απεναντίας, για τα μοντέλα που αναφέρονται στην Σηματοδοσία εντός του κυττάρου και στην Έκφραση Γονιδίων (και στην διαδικασία ρύθμισης αυτής), διαδικασίες στις οποίες και εμπλέκονται μικροί αριθμοί μορίων αλλά και κάθε γεγονός έχει σημαντική αξία για την εξέλιξη του συστήματος, η Στοχαστική Προσομοίωση θεωρείται ότι προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα.

Ένας ακόμα παράγοντας που υποστηρίζει την χρήση Στοχαστικής Προσομοίωσης είναι αυτός του θορύβου που εμφανίζεται στα διάφορα βιολογικά συστήματος. Με τον όρο Θόρυβο, εννοείται η τυχειότητα που εμφανίζεται στις διάφορες βιολογικές διαδικασίες. Για παράδειγμα ο θόρυβος στην έκφραση γονιδίων μπορεί να αναφέρεται στην στοχαστική-τυχαία διαφοροποίηση των επιπέδων της ίδιας εκφραζόμενης πρωτεΐνης μεταξύ ομοίων κυττάρων τα οποία έχουν το ίδιο ιστορικό και βρίσκονται υπό τις ίδιες συνθήκες [24].

Οι δύο μορφές θορύβου που επηρεάζουν την συμπεριφορά ενός βιολογικού συστήματος είναι [37, 24] ο εγγενής θόρυβος (intrinsic noise) και ο εξωγενής θόρυβος (extrinsic noise). Οι συνθήκες και ο τρόπος κατά τον οποίο εμφανίζεται ο κάθε θόρυβος περιγράφονται με λεπτομέρεια στις προηγούμενες αναφερόμενες εργασίες. Ωστόσο ένα παράδειγμα διαχωρισμού των δύο θορύβων μπορεί να δοθεί για ένα (όχι κατ' ανάγκη) υποθετικό σύστημα το οποίο περιέχει δύο υποκινητές γονιδίου στο ίδιο κύτταρο. Ποσοτικοποιώντας την έκφραση της αντίστοιχης πρωτεΐνης, μπορούμε να πούμε ότι ο εγγενής θόρυβος αφορά σε πηγές θορύβου που οδηγούν σε διαφορές στην έκφραση μέσω των δύο υποκινητών στο ίδιο κύτταρο ενώ ο εξωγενής θόρυβος αφορά σε πηγές θορύβου που έχουν την ίδια επιρροή και στους δύο υποκινητές του ίδιου κυττάρου αλλά προκαλούν διαφορές μεταξύ δύο κυττάρων. Τα ζητήματα αυτά είναι ιδιαίτερα σημαντικά μιας και πλέον είναι αποδεκτό ότι μεταξύ ακόμα και ίδιων κυττάρων που βρίσκονται στο ίδιο περιβάλλον εμφανίζεται σε μικρό ή μεγάλο βαθμό ετερογένεια στην συμπεριφορά την οποία μόνο η Στοχαστική Προσομοίωση μπορεί να προβλέψει [37].

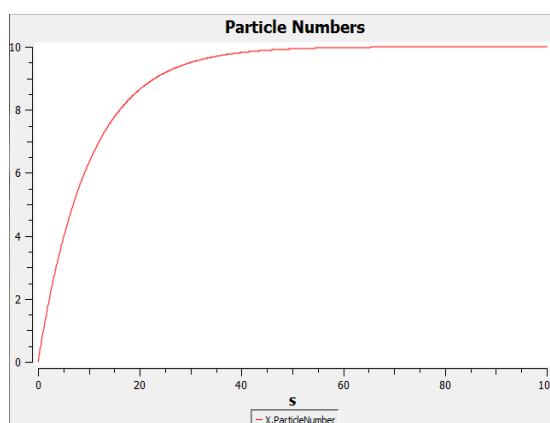
Για την παρουσίαση, τώρα, των διαφορετικών χαρακτηριστικών των αποτελεσμάτων που μπορούν να μας δώσουν οι δύο προσεγγίσεις, αρκεί η χρήση ενός ιδιαίτερα απλού μοντέλου, όπως προτείνεται στην [37]. Το μοντέλο αποτελείται από μία οντότητα, έστω τη X και δύο αντιδράσεις, την παραγωγή της X από μία πηγή και την αποδόμηση της X . Οι αντιδράσεις αυτές μπορούν να γραφούν σύμφωνα με τα όσα παρουσιάστηκαν προηγούμενως, ως εξής:



οι παράμετροι α και μ αποτελούν τους ρυθμούς των αντίστοιχων αντιδράσεων με τιμές 1 και 0.1. αντίστοιχα, ενώ αρχικά τα επίπεδα της X είναι μηδενικά.

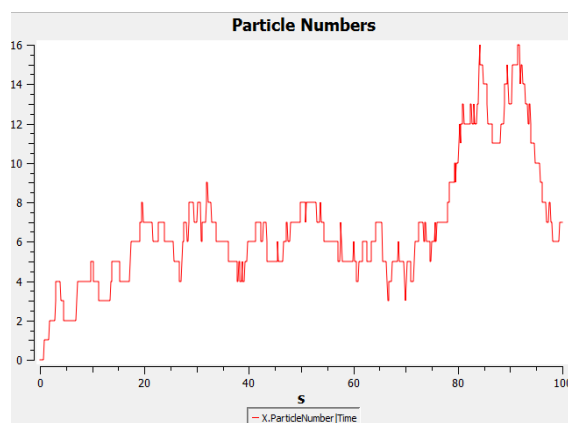
Για τις ανάγκες παρουσίασης, το μοντέλο δημιουργήθηκε στο λογισμικό COPASI και τα αποτελέσματα της προσομοίωσης για 100 δευτερόλεπτα δίνονται στα ακόλουθα σχήματα.

Ντετερμινιστική Προσομοίωση



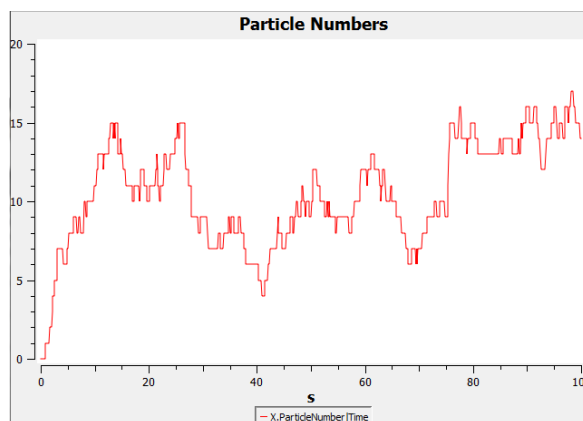
Σχήμα 2.1 Παράδειγμα Ντετερμινιστικής Προσομοίωσης

Στοχαστική Προσομοίωση (Πρώτη Εκτέλεση)



Σχήμα 2.2 Παράδειγμα Στοχαστικής Προσομοίωσης (1^η εκτέλεση)

Στοχαστική Προσομοίωση (Δεύτερη Εκτέλεση)



Σχήμα 2.3 Παράδειγμα Στοχαστικής Προσομοίωσης (2^η εκτέλεση)

Όπως είναι εύκολα αντιληπτό, υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων που δίνονται από τους δύο τύπους προσομοίωσης. Κύρια διαφορά αποτελεί ότι για την περίπτωση της Ντετερμινιστικής Προσομοίωσης, από ένα σημείο της προσομοίωσης και μετά, το σύστημα παύει να παρουσιάζει την οποιαδήποτε δυναμική συμπεριφορά και τα επίπεδα της X , παραμένουν σταθερά. Απεναντίας κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει για την περίπτωση της Στοχαστικής Προσομοίωσης, κατά την οποία λόγω της τυχαιότητας στο αν θα συμβεί αντίδραση παραγωγής ή αντίδραση αποδόμησης κάθε στιγμή, τα επίπεδα της X , μεταβάλλονται συνεχώς. Αν η συγκεκριμένη οντότητα, αποτελούσε μέρος ενός μεγαλύτερου συστήματος με σημαντική επιρροή σε αυτό, πολύ πιθανόν αυτές οι διακυμάνσεις να είχαν σημαντικό αντίκτυπο στη συνολική συμπεριφορά του συστήματος, κάτι που δεν θα συνέβαινε κατά τον ίδιο τρόπο με τη χρήση Ντετερμινιστικής Προσομοίωσης. Ακόμα, ένα πολύ σημαντικό συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί από τα δύο σχήματα που αφορούν στην Στοχαστική Προσομοίωση, έχει να κάνει με τα διαφορετικά αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτή σε κάθε περίπτωση, πάλι λόγω της τυχαιότητας στην πραγματοποίηση των αντιδράσεων. Η συμπεριφορά αυτή είναι ιδιαίτερα σημαντική για

την όσο το δυνατόν ακριβέστερη προσομοίωση των Βιολογικών Συστημάτων, δεδομένης της σημαντικής ετερογένειας που εμφανίζεται στην συμπεριφορά αυτών, όπως σημειώθηκε προηγουμένως.

Ακολούθως παρουσιάζονται τα πλαίσια εξειδίκευσης του ορισμού των Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων και οι μέθοδοι που ακολουθούνται κατά περίπτωση για την προσομοίωση αυτών.

2.2.1 Ντετερμινιστική Προσομοίωση

Η παρουσίαση που ακολουθεί στην συγκεκριμένη ενότητα βασίζεται στην αντίστοιχη παρουσίαση που δίνεται στην [24].

Θεωρώντας ότι οι αντιδράσεις που συμμετέχουν στο σύστημα συμβαίνουν τόσο συχνά ώστε ο αριθμός πραγματοποίησης αντιδράσεων $Z(t)$, μπορεί να προσεγγιστεί από μία συνεχή ποσότητα $z(t)$ και ότι:

- Ένας μεγάλος αριθμός αντιδρώντων μορίων είναι διαθέσιμος σε ένα αρκετά μεγάλο όγκο με δυνατότητα να αντιδράσουν εύκολα
- Η ενέργεια και ο προσανατολισμός των μορίων ευνοούν την πραγματοποίηση της αντίδρασης (κάτι που περιγράφεται από την σταθερά ρυθμού της αντίδρασης) και ότι
- Λόγω του υψηλού αριθμού μορίων η μία πραγματοποίηση μίας αντίδρασης οδηγεί σε μικρής κλίμακας αλλαγή στη συνολική κατάσταση του συστήματος

τότε, η πολλαπλότητα των οντοτήτων $N(t)$ αλλά και η συγκέντρωση αυτών $X(t)$, μπορούν και αυτές να προσεγγιστεί από συνεχείς ποσότητες $n(t)$ και $x(t)$.

Με βάση τα παραπάνω, λαμβάνουμε την Ντετερμινιστική μορφή των εξισώσεων Εξίσωση 2.2 και Εξίσωση 2.3 η οποία είναι

$$n(t) = n(0) + Sz(t)$$

Εξίσωση 2.4

και

$$x(t) = x(0) + \frac{Sz(t)}{\Omega}$$

Εξίσωση 2.5

Παραγωγίζοντας τώρα ως προς το χρόνο, λαμβάνουμε τις Ντετερμινιστικές Χημικές Κινητικές Εξισώσεις:

$$\dot{x}(t) = Sv(x(t))$$

Εξίσωση 2.6

όπου $v = \frac{\dot{z}}{\Omega}$, το διάνυσμα ρυθμών αντίδρασης, με v_j να ισούται με το ρυθμό της αντίδρασης R_j . Άρα ο ρυθμός της αντίδρασης είναι ίσος με τον αριθμό των

επαναλήψεων της αντίδρασης ανά μονάδα χρόνου, διαιρεμένος με το μέγεθος του συστήματος, ενώ ο συμβολισμός $v(x(t))$ επιλέγεται λόγω της παραδοχής ότι οι συγκεκριμένοι ρυθμοί εξαρτώνται μόνο από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων. Παρότι αυτή η παραδοχή είναι ρεαλιστική σε πολλές περιπτώσεις, γενικά οι ρυθμοί των αντιδράσεων, όπως είναι αναμενόμενο, μπορούν να εξαρτώνται από την θερμοκρασία, την πίεση αλλά και από τις συγκεντρώσεις άλλων οντοτήτων που εμπλέκονται στο υπό μελέτη σύστημα.

Έχοντας ορίσει τα παραπάνω, η συναρτησιακή μορφή $v_j(\cdot)$ του ρυθμού της R_j καλείται Κινητικός Νόμος και αποτελεί συμπέρασμα των παραδοχών μοντελοποίησης των καναλιών αντιδράσεων. Ο ορισμός του Κινητικού Νόμου για κάθε αντίδραση αποτελεί το ουσιαστικό βήμα εξειδίκευσης των Διαφορικών Εξισώσεων της Εξίσωσης Εξίσωση 2.6 έτσι ώστε να μπορούν να χαρακτηρίσουν ένα Δίκτυο Βιοχημικών Αντιδράσεων και τη συμπεριφορά αυτού, ενώ χωρίς των ορισμό τους αποτελούν ένα σύνολο κανόνων διατήρησης της μάζας μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων.

Μία ιδιαίτερα σημαντική κατηγορία Κινητικών Νόμων είναι αυτή κατά την οποία ο ρυθμός της αντίδρασης είναι ανάλογος της συγκέντρωσης ή των επιπέδων του κάθε αντιδρώντος μορίου, υψωμένων σε κάποια δύναμη. Οι κινητικοί νόμοι αυτής της μορφής ονομάζονται Κινητικοί Νόμοι με οριστική κατάταξη (Definite Orders) και έχουν την ακόλουθη αναπαράσταση:

$$v_j(x) = k_j \prod_{i=1}^s x_i^{g_{ij}}$$

Εξίσωση 2.7

με την σταθερά ρυθμού της αντίδρασης k_j να αντιπροσωπεύει διάφορους παράγοντες, όπως την επάρκεια ενέργειας και τον κατάλληλο προσανατολισμό των αντιδρώντων για να πραγματοποιηθεί η αντίστοιχη αντίδραση.

Αν τώρα οι αντιδράσεις είναι στοιχειώσεις τότε οι g_{ij} ισούνται με τις στοιχειομετρίες των αντιδράσεων S_{ij} (τις σχετικές με τα αντιδρώντα) και έτσι έχουμε:

$$v_j(x) = k_j \prod_{i=1}^s x_i^{S_{ij}}$$

Εξίσωση 2.8

Οι κινητικοί νόμοι που δίδονται σε αυτή τη μορφή αποτελούν την κατηγορία νόμων της Δράσης Μάζας (Mass Action)

Ως ένα πρακτικό παράδειγμα των παραπάνω, στο μοντέλου Schlögl που δόθηκε στην προηγούμενη ενότητα, αν συμβολίσουμε ως x_A, x_B και x τις συγκεντρώσεις των οντοτήτων A, B και X τότε για την περίπτωση του Κινητικού Νόμου Mass action έχουμε:

$$v_1 = k_1 x_A x^2, v_2 = k_2 x^3, v_3 = k_3 x_B, v_4 = k_4 x$$

και τα επίπεδα της X στο χρόνο δίνονται από την Ντετερμινιστική Συνήθη Διαφορική Εξίσωση:

$$\frac{dx}{dt} = v_1 - v_2 + v_3 - v_4 = k_1 x_A x^2 - k_2 x^3 + k_3 x_B - k_4 x$$

Εξίσωση 2.9

Όπως εύκολα μπορεί να γίνει αντιληπτό, άρα, για την Ντετερμινιστική Προσομοίωση ενός Δικτύου Βιοχημικών αντιδράσεων, έπεται από τον ορισμό του, όπως αυτός παρουσιάστηκε προηγουμένως, αρκεί η χρήση ενός προγράμματος επίλυσης Συνήθων Διαφορικών Εξισώσεων. Η λεπτομερής περιγραφή των διαφόρων αλγορίθμων ξεφεύγει από τα όρια της σύντομης παρουσίασης που γίνεται στην παρούσα εργασία, ωστόσο, αυτού του τύπου οι αλγόριθμοι προσφέρονται από μία πληθώρα εργαλείων είτε γενικού σκοπού (όπως η MATLAB, η R και η Mathematica) είτε εξειδικευμένης φύσης για προβλήματα Συστημικής Βιολογίας (όπως τα COPASI, Cell Designer, SimBiology Toolbox).

2.2.2 Στοχαστική Προσομοίωση

Οι περιπτώσεις και οι λόγοι για τους οποίους είναι αναγκαία η Στοχαστική δόθηκαν στην Ενότητα 2.2. Στην παρούσα ενότητα δίνεται το μαθηματικό πλαίσιο της Στοχαστικής Προσομοίωσης και ο τρόπος ορισμού των Βιοχημικών Δικτύων μέσω αυτού. Η παρουσίαση που ακολουθεί βασίζεται στην αντίστοιχη που δίνεται στην [36].

Θεωρώντας ένα ομοιογενές (well-stirred) σύστημα μοριακών οντοτήτων που αντιδρούν μεταξύ τους μέσω βιοχημικών αντιδράσεων, και κάνοντας την παραδοχή ότι το σύστημα βρίσκεται σε σταθερό όγκο V και σε θερμική (αλλά όχι χημική) ισορροπία, στόχος (και) της Στοχαστικής Προσομοίωσης είναι η εκτίμηση του διανύσματος $\mathbf{X}(t) = (X_1(t), \dots, X_N(t))$, δηλαδή των επιπέδων των διαφόρων οντοτήτων, δεδομένου ότι το σύστημα αρχικά βρισκόταν στην κατάσταση $\mathbf{X}(t_0) = \mathbf{x}_0$.

Κεντρική παραδοχή για την προσέγγιση που θα παρουσιαστεί είναι ότι μπορούμε να περιγράψουμε επαρκώς την κατάσταση του συστήματος, καθορίζοντας μόνο τα επίπεδα των διαφόρων μοριακών οντοτήτων, αγνοώντας τις θέσεις τους και τις ταχύτητές τους. Οι λόγοι που καθιστούν κάτι τέτοιο ρεαλιστικό δίνονται με λεπτομέρεια στην [36].

Όπως και στην Ντετερμινιστική Προσομοίωση, οι αλλαγές των επιπέδων των οντοτήτων είναι αποτέλεσμα της πραγματοποίησης αντιδράσεων. Για την περίπτωση της Στοχαστικής Προσομοίωσης, κάθε κανάλι αντίδρασης χαρακτηρίζεται από δύο ποσότητες:

- Από το διάνυσμα $\mathbf{S}_j = (S_{1j}, \dots, S_{Nj})$, των αλλαγών στα επίπεδα των οντοτήτων κατά την πραγματοποίηση της αντίδρασης R_j , όπως ακριβώς και στην Ντετερμινιστική περίπτωση

- Από τη συνάρτηση propensity a_j η οποία ορίζεται ως

$a_j(\mathbf{x})dt \triangleq$ η πιθανότητα, δοσμένου ότι $\mathbf{X}(t) = \mathbf{x}$, να πραγματοποιηθεί μία αντίδραση R_j , εντός του όγκου στον οποίο βρίσκεται το σύστημα, στο επόμενο απειροστό χρονικό διάστημα $[t, t + dt)$.

Ορισμός 2.1

Για την πιθανότητα αυτή, τώρα, ισχύουν τα εξής:

- Αν η αντίδραση R_j είναι μονομοριακή, η κβαντική μηχανική ορίζει ότι υπάρχει κάποια σταθερά c_j , τέτοια ώστε η πιθανότητα ότι κάθε ξεχωριστή οντότητα X_j θα αντιδράσει στο επόμενο απειροστό χρονικό διάστημα dt , ισούται με $c_j dt$. Έτσι από τους νόμους των πιθανοτήτων προκύπτει ότι αν υπάρχει x_1 μόρια της οντότητας X_1 στο σύστημα, η πιθανότητα ότι κάποιο από αυτά θα ακολουθήσει την R_j αντίδραση είναι $x_1 \cdot c_j dt$. Έτσι για αυτή την περίπτωση:

$$a_j(\mathbf{x}) = c_j x_1$$

Εξίσωση 2.10

- Αν τώρα στην R_j εμπλέκονται δύο μόρια, η κινητική θεωρία αλλά και η ομοιογενής (well-stirred) κατάσταση του συστήματος, ορίζουν ότι υπάρχει μία σταθερά c_j , τέτοια ώστε η πιθανότητα ένα τυχαία επιλεγμένα ζευγάρι μορίων X_1 και X_2 θα αντιδράσει μέσω της R_j στο επόμενο απειροστό χρονικό διάστημα dt , να ισούται με $c_j dt$. Έτσι, η πιθανότητα ότι ένα από τα $x_1 x_2$ ζευγάρια οντοτήτων X_1 και X_2 θα αντιδράσει μέσω της R_j εντός του όγκου του συστήματος ισούται με $x_1 x_2 \cdot c_j dt$ και τότε η συνάρτηση propensity δίνεται από την:

$$a_j(\mathbf{x}) = c_j x_1 x_2$$

Εξίσωση 2.11

Στην περίπτωση τώρα που τα δύο αντιδρώντα μόρια είναι του ίδιου τύπου, η propensity δίνεται από την:

$$a_j(\mathbf{x}) = c_j \frac{1}{2} x_1 (x_1 - 1)$$

Εξίσωση 2.12

Ιδιαίτερα σημαντικό συμπέρασμα, το οποίο περιγράφεται με λεπτομέρεια στην [36], είναι ότι για τις τιμές των c_j ισχύει:

- Για τις μονομοριακές αντιδράσεις η c_j ισούται αριθμητικά με την τιμή της σταθεράς ρυθμού αντίδρασης k_j όπως αυτή ορίστηκε για την Ντετερμινιστική Προσομοίωση
- Για τις διμοριακές αντιδράσεις η c_j ισούται με $\frac{k_j}{V}$ για την περίπτωση διαφορετικών οντοτήτων και με $\frac{2k_j}{V}$ για την περίπτωση ίδιων οντοτήτων.

Παρά τον ορισμό των παραπάνω, ωστόσο, η πιθανοτική φύση του ορισμού της propensity δεν επιτρέπει ακριβείς προβλέψεις των $\mathbf{X}(t)$. Παρόλα αυτά θα μπορούσε να εκτιμηθεί η πιθανότητα

$$P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0) \triangleq \text{Prob}[\mathbf{X}(t) = \mathbf{x}, \text{δεδομένου ότι } \mathbf{X}(t_0) = \mathbf{x}_0]$$

Εξίσωση 2.13

Από την ανωτέρω εξίσωση και από τον ορισμό της Propensity προκύπτει η Κύρια Χημική Εξίσωση (Chemical Master Equation-CME):

$$\frac{\partial P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0)}{\partial t} = \sum_{j=1}^M [a_j(\mathbf{x} - \mathbf{s}_j) P(\mathbf{x} - \mathbf{s}_j, t | \mathbf{x}_0, t_0) - a_j(\mathbf{x}) P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0)]$$

Εξίσωση 2.14

Παρότι η CME ορίζει πλήρως την $P(\mathbf{x}, t | \mathbf{x}_0, t_0)$, μόνο σε πολύ λίγες περιπτώσεις μπορεί να δεχθεί αναλυτική λύση. Έτσι η λύση που προτείνεται είναι η παραγωγή αριθμητικών πραγματοποιήσεων της $\mathbf{X}(t)$ μέσω προσομοίωσης. Για να πραγματοποιηθεί κάτι τέτοιο, χρειάζεται να οριστεί μία νέα πιθανότητα:

$p(\tau, j | \mathbf{x}, t) d\tau \triangleq$ η πιθανότητα, δεδομένου ότι $\mathbf{X}(t) = \mathbf{x}$, η επόμενη αντίδραση στο σύστημα να συμβεί στο απειροστό χρονικό διάστημα $[t + \tau, t + \tau + d\tau)$ και να είναι η R_j

Ορισμός 2.2

η οποία ουσιαστικά είναι η από κοινού πυκνότητα πιθανότητας των τυχαίων μεταβλητών του χρόνου για την πραγματοποίηση της επόμενης αντίδρασης (τ) και τύπου της αντίδρασης αυτής (j).

Όπως σημειώνεται στην [36] και στις εκεί αναφερόμενες εργασίες, για την συγκεκριμένη πιθανότητα ισχύει:

$$p(\tau, j | \mathbf{x}, t) = a_j(\mathbf{x}) \exp(-a_0(\mathbf{x})\tau)$$

Εξίσωση 2.15

όπου

$$\alpha_0(\mathbf{x}) = \sum_{j'=1}^M \alpha_{j'}(\mathbf{x})$$

Εξίσωση 2.16

Η Εξίσωση 2.15 αποτελεί τη βάση για τη Στοχαστική Προσομοίωση των Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων, ορίζοντας ότι:

- η τ ακολουθεί εκθετική κατανομή με μέση τιμή και διακύμανση $\frac{1}{\alpha_0(\mathbf{x})}$
- η j είναι μία στατιστικώς ανεξάρτητη ακέραια τυχαία μεταβλητή με σημειακές πιθανότητες $\frac{\alpha_j(\mathbf{x})}{\alpha_0(\mathbf{x})}$

Για την λήψη δειγμάτων από τις κατανομές των τ και j μπορούν να ακολουθηθούν διάφορες ακριβείς Monte Carlo διαδικασίες [38]. Η σημαντικότερη αλλά και απλούστερη είναι ο Αλγόριθμος Στοχαστικής Προσομοίωσης Ευθείας Μεθόδου (Stochastic Simulation Algorithm - SSA / Direct Method) ο οποίος παρουσιάζεται στην επόμενη ενότητα.

2.2.2.1 Ο αλγόριθμος SSA

Ο αλγόριθμος SSA, Direct Method [39, 40] αποτελεί τον πρώτο αλγόριθμο προσομοίωσης Βιοχημικών Αντιδράσεων. Τα βήματα του αλγορίθμου έχουν ως εξής:

1. Υπολογίζονται δύο τυχαίοι αριθμοί r_1 και r_2 στο διάστημα $[0,1]$ από την ομοιόμορφη κατανομή και λαμβάνονται τα δείγματα:

$$j = \text{o μικρότερος ακέραιος που ικανοποιεί την } \sum_{j'=1}^j \alpha_{j'}(\mathbf{x}) > r_2 \alpha_0(\mathbf{x})$$

2. Αρχικοποιείται ο χρόνος σε $t = t_0$ και το Σύστημα στην κατάσταση $\mathbf{x} = \mathbf{x}_0$
3. Για το Σύστημα στην κατάσταση $\mathbf{x}$ τη χρονική στιγμή t , υπολογίζονται οι τιμές των συναρτήσεων propensity $\alpha_j(\mathbf{x})$ και το άθροισμα αυτών $\alpha_0(\mathbf{x})$
4. Λαμβάνονται δύο δείγματα μέσω των

$$\tau = \frac{1}{\alpha_0(\mathbf{x})} \ln\left(\frac{1}{r_1}\right)$$

Εξίσωση 2.17

και

$$j = \text{o μικρότερος ακέραιος που ικανοποιεί την } \sum_{j'=1}^j \alpha_{j'}(\mathbf{x}) > r_2 \alpha_0(\mathbf{x})$$

Εξίσωση 2.18

5. Πραγματοποιείται η επόμενη αντίδραση αντικαθιστώντας:

- $t \leftarrow t + \tau$
- $x \leftarrow x + S_j$

6. Επιστροφή στο βήμα 1 ή τερματισμός της Προσομοίωσης.

Μία ισοδύναμη υλοποίηση του SSA είναι αυτή με τη μέθοδο της Πρώτης Αντίδρασης (First Reaction Method) η οποία παρουσιάστηκε στην ίδια εργασία [39] με αυτή που παρουσιάστηκε ο SSA Direct Method. Η μέθοδος Πρώτης Αντίδρασης, αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο για την δημιουργία των τιμών των τ και j . Στη συγκεκριμένη μέθοδο, αρχικά λαμβάνονται M τυχαίοι αριθμοί $r_1, \dots, r_M$ από την ομοιόμορφη κατανομή στο διάστημα $[0,1]$ και υπολογίζεται η

$$\tau_{j'} = \frac{1}{a_{j'}'(x)} \ln \left(\frac{1}{r_{j'}} \right) \quad (j' = 1, \dots, M)$$

Εξίσωση 2.19

Στη συνέχεια λαμβάνονται:

$$\tau = \text{ο μικρότερος μεταξύ των } \{\tau_{j'}\} \\ l = \text{ο αύξων αριθμός του μικρότερου } \{\tau_{j'}\}$$

Εξίσωση 2.20

και τέλος:

$$j = \text{ο μικρότερος ακέραιος που ικανοποιεί την } \sum_{j'=1}^j a_{j'}^l(x) > r_{l+1} a_0^l(x)$$

Εξίσωση 2.21

Θα πρέπει να σημειωθεί ιδιαίτερα ότι ο SSA και η CME προκύπτουν και οι δύο, χωρίς καμία προσέγγιση από τον Ορισμός 2.1, έτσι υπάρχει λογική ισοδυναμία μεταξύ τους. Ωστόσο, παρότι ο SSA καταφέρνει να δώσει λύση στο δισεπίλυτο της CME, είναι υπολογιστικά ιδιαίτερα απαιτητικός παρά την ιδιαίτερα απλή μορφή του. Γι' αυτό το λόγο έχουν προταθεί διάφορες παραλλαγές και εναλλακτικές/προσεγγιστικές λύσεις του, οι οποίες παρουσιάζονται στις ακόλουθες ενότητες.

2.2.2.2 Η μέθοδος της Επόμενης Αντίδρασης

Δεδομένης της υψηλής υπολογιστικής πολυπλοκότητας που παρουσιάζουν και η Direct Method αλλά και η First Reaction Method, υπήρξε η ανάγκη μείωσης αυτής. Κάτι τέτοιο επετεύχθη από του Gibson και Bruck μέσω της ευφυέστερης διαχείρισης των δομών δεδομένων, προτείνοντας τον αλγόριθμο της Επόμενης Αντίδρασης (Next Reaction) [41]. Ο συγκεκριμένος αλγόριθμος παρουσιάζει τα εξής ιδιαίτερα χαρακτηριστικά:

- Δημιουργείται ένας γράφος εξαρτήσεων μεταξύ των αντιδράσεων. Σε αυτό το γράφο υπάρχει ένας κόμβος για κάθε αντίδραση R_j και μία ακμή (j, k) από τον συγκεκριμένο κόμβο σε κάθε άλλο κόμβο R_k στην οποία συμμετέχει αντιδρών το

οποίο αποτελεί αντιδρών ή προϊόν της R_j . Με τη χρήση αυτού του γράφου, αποφεύγεται ο άσκοπος επανυπολογισμός αρκετών από τις propensities a_j όταν αυτές δεν επηρεάζονται από τις πραγματοποιηθείσες αντιδράσεις.

- Χρησιμοποιούνται απόλυτοι χρόνοι πραγματοποίησης αντίδρασης από την αρχή της προσομοίωσης αντί των σχετικών από την πραγματοποίηση της τελευταίας αντίδρασης. Επίσης, οι τυχαίοι αριθμοί «ανακυκλώνονται» κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης την ανανέωσης του χρόνου πραγματοποίησης αντίδρασης.
- Χρησιμοποιείται μία ουρά προτεραιότητας που περιέχει όλες τις αντιδράσεις, ταξινομημένες βάσει του χρόνου πραγματοποίησης τους. Έτσι η επόμενη αντίδραση μπορεί να βρεθεί μέσω της συγκεκριμένης δομής σε σταθερό χρόνο.

Τα βήματα του αλγορίθμου έχουν ως εξής:

1. Αρχικοποίηση:

- a. $t = t_0$ και $x = x_0$
- b. Δημιουργία του γράφου εξαρτήσεων G .
- c. Υπολογισμός των συναρτήσεων propensity $a_j(x)$ στην κατάσταση x
- d. Για κάθε j , υπολογισμός του χρόνου τ_j μέχρι την επόμενη R_j αντίδραση

$$\tau_j = t + \frac{1}{a_j(x)} \ln \left(\frac{1}{r_j} \right)$$

Εξίσωση 2.22

με r_j τυχαίους αριθμούς από την ομοιόμορφη κατανομή στο διάστημα $[0,1]$

- e. Αποθήκευση των χρόνων τ_j στην ουρά προτεραιότητας Q
2. Αν R_μ είναι η αντίδραση με τον μικρότερο χρόνο στην Q , τ_μ
 3. Τίθεται τ ίσο με τ_μ
 4. Υπολογισμός της νέας κατάστασης του συστήματος μετά την πραγματοποίηση της αντίδρασης R_μ , $t = \tau$ και $x = x + S_\mu$
 5. Για κάθε ακμή (μ, α) στο γράφο εξαρτήσεων G :
 - a. Τίθεται $\alpha_{\alpha,old} = a_\alpha$ και ανανεώνεται η a_α
 - b. Αν $\alpha \neq \mu$, τίθεται $\tau_\alpha = \left(\frac{\alpha_{\alpha,old}}{a_\alpha} \right) (\tau_\alpha - t) + t$
 - c. Αν $\alpha = \mu$, λαμβάνεται ένας τυχαίος αριθμός r_μ και υπολογίζεται:

$$\tau_{\mu} = \tau + \frac{1}{a_{\mu}(x)} \ln\left(\frac{1}{r_{\mu}}\right)$$

Εξίσωση 2.23

6. Αν t είναι μεγαλύτερος από τον χρόνο προσομοίωσης, τερματισμός
7. Καταγραφή της (x, t) και επιστροφή στο βήμα 2.

2.3 Εναλλακτικές Μέθοδοι Προσομοίωσης

Όπως συμπερασματικά μπορεί να εξαχθεί από τις προηγούμενες ενότητες, η κάθε κατηγορία μαθηματικής μοντελοποίησης και προσομοίωσης των Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων έχει σημαντικά πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Στα πλεονεκτήματα της Ντετερμινιστικής Προσομοίωσης μπορούν να συγκαταλεχθούν οι σχετικά μειωμένες απαιτήσεις σε υπολογιστικό χρόνο, ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις παρουσιάζει μειωμένη ακρίβεια. Απεναντίας, η Στοχαστική Προσομοίωση, παρότι ιδιαίτερα ακριβής καθότι λαμβάνει υπόψη της την πραγματοποίηση κάθε αντίδρασης σε διακριτά πλαίσια, παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλές απαιτήσεις υπολογιστικής ισχύος. Στην προσπάθεια, λοιπόν, να συνδυαστούν τα πλεονεκτήματα των δύο προσεγγίσεων, στην βιβλιογραφία έχει προταθεί ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων προς αυτό το στόχο, οι οποίες συνοψίζονται στις εργασίες [36] και [42]. Οι δύο κύριες κατηγορίες αυτών των μεθόδων αποτελούν οι Προσεγγιστικά Στοχαστικοί (Approximate Stochastic) και οι Υβριδικοί Αλγόριθμοι. Σημαντικός εκπρόσωπος της πρώτης κατηγορίας αποτελεί ο αλγόριθμος Προσομοίωσης με άλματα (Tau-leaping) ενώ για την δεύτερη κατηγορία, παρότι έχει προταθεί ένας μεγάλος αριθμός αλγορίθμων, οι οποίοι συνοψίζονται στην [42], υπάρχουν ακόμα σημαντικά ανοιχτά ζητήματα. Στις ακόλουθες ενότητες παρουσιάζονται ο αλγόριθμος Tau-leaping και οι βασικές αρχές των Υβριδικών αλγορίθμων.

2.3.1 Προσομοίωση με άλματα

Ο προσεγγιστικά στοχαστικός αλγόριθμος προσομοίωσης με άλματα, Tau-leaping ή τ -Leap, προτάθηκε από τον ίδιο επιστήμονα από τον οποίο προτάθηκε και ο SSA (Daniel Gillespie) στην εργασία [43]. Στην συγκεκριμένη μέθοδο αποφεύγεται η προσομοίωση κάθε ενός ξεχωριστού γεγονότος αντίδρασης, αλλά πραγματοποιείται ένα άλμα στο χρόνο, μήκους τ , στο οποίο συμπεριλαμβάνονται πολλά γεγονότα αντίδρασης.

Προϋπόθεση για την εκτέλεση του αλγορίθμου είναι το τ να πληροί την συνθήκη να είναι αρκούντως μικρό ώστε να μην συμβαίνει σημαντική αλλαγή στις propensities a_j των αντιδράσεων κατά το χρονικό διάστημα $[t, t + \tau]$. Αν αυτή η συνθήκη καλύπτεται, τότε, τα κανάλια αντιδράσεων αποδεδμεύονται μεταξύ τους και ο αριθμός των πραγματοποιήσεων κάθε αντίδρασης K_j , κατά τη διάρκεια του τ , με αρχική κατάσταση την κατάσταση x και αρχικό χρόνο t , μπορεί να προσεγγιστεί από τυχαίες μεταβλητές που ακολουθούν Poisson κατανομή:

$$K_j(\tau; x, t) = P(a_j(x), \tau)$$

Εξίσωση 2.24

$$\text{με } \text{Prob}\{P(a_j, \tau) = k\} = \frac{(a_j \tau)^k}{k!} e^{-a_j \tau}$$

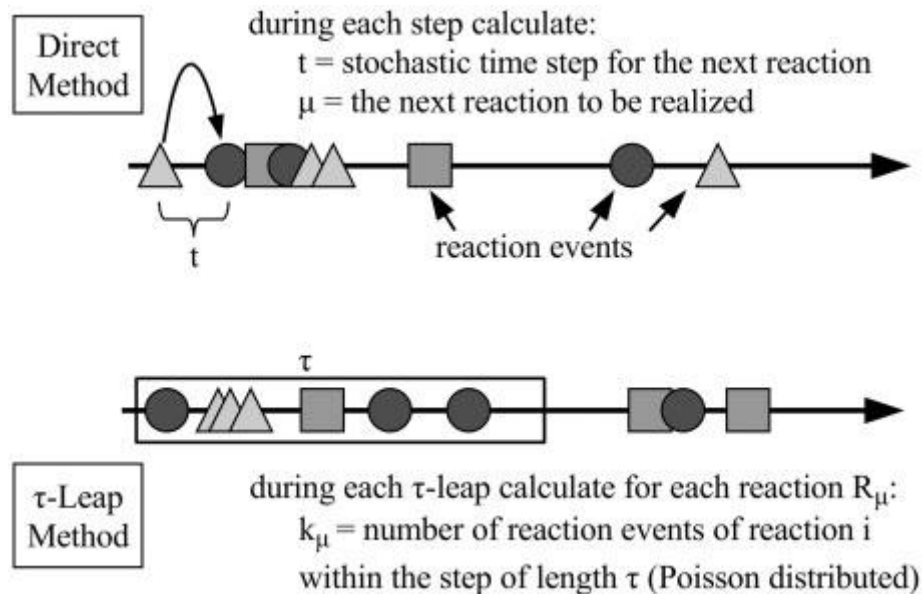
Έτσι, σε κάθε βήμα της προσομοίωσης, λαμβάνεται ένας τυχαίος αριθμός από την κατανομή Poisson k_j για κάθε αντίδραση R_j και η κατάσταση του συστήματος ανανεώνεται βάσει της:

$$x(t + \tau) = x(t) + \sum_{j=1}^M k_j \nu_j$$

Εξίσωση 2.25

Θα πρέπει να σημειωθεί, ότι, λόγω της λήψης δειγμάτων από Poisson κατανομή, κάθε βήμα του Tau-Leaping, είναι υπολογιστικά πιο απαιτητικό σε σχέση με ένα βήμα του SSA (είτε Direct είτε First Reaction Method). Ωστόσο, επειδή πολλά βήματα της προσομοίωσης μπορούν να «προσπεραστούν» όταν το τ είναι αρκούντως μεγάλο, η προσομοίωση γενικά μπορεί να εκτελεστεί πολύ πιο γρήγορα.

Στο ακόλουθο σχήμα, συμπυκνώνεται η φιλοσοφία του αλγορίθμου.



Σχήμα 2.4 Η φιλοσοφία του αλγορίθμου Tau-leaping [42]

2.3.2 Προσομοίωση μέσω Στοχαστικών Διαφορικών Εξισώσεων

Στην προσπάθεια ακόμα μεγαλύτερης μείωσης του υπολογιστικού κόστους της Στοχαστικής Προσομοίωσης, αν η τιμή του τ μπορεί να επιλεγεί αρκούντως μεγάλη έτσι ώστε κάθε κανάλι αντίδρασης, κατά μέσο όρο, να πραγματοποιεί ένα πολύ μεγάλο αριθμό πραγματοποιήσεων ($P(a_j(x), \tau) = a_j(x) \tau \gg 1$) ενώ ταυτόχρονα ικανοποιείται η συνθήκη του Tau-Leaping, τότε οι τυχαίες μεταβλητές Poisson μπορούν να

προσεγγιστούν από τυχαίες μεταβλητές N_j που ακολουθούν την κανονική κατανομή [44] και έτσι:

$$\begin{aligned} K_j(\tau; x, t) &= P_j(a_j(x), \tau) \\ &\approx N_j(a_j(x)\tau, a_j(x)\tau) \\ &= a_j(x)\tau + \sqrt{a_j(x)\tau} \cdot N_j(0,1) \end{aligned}$$

Εξίσωση 2.26

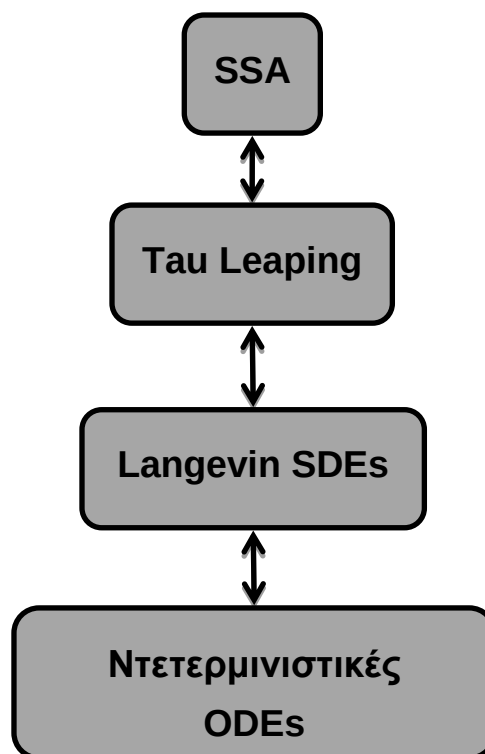
Αν ισχύουν τα παραπάνω, τότε οι μεταβάσεις των καταστάσεων του Συστήματος δίνονται από την (χημική) Langevin εξίσωση, η οποία είναι μία Στοχαστική Διαφορική Εξίσωση (Stochastic Differential Equation/SDE) [45], δηλαδή:

$$x(t + \tau) = x(t) + \sum_{j=1}^M v_j a_j(x)\tau + \sum_{j=1}^M v_j \times \sqrt{a_j(x)\tau} \cdot n_j$$

Εξίσωση 2.27

όπου n_j κανονικές τυχαίες μεταβλητές στο διάστημα $[0,1]$.

Όπως είναι εύκολο να παρατηρηθεί, αν $a_j(x)\tau \rightarrow \infty$, τότε ο τελευταίος όρος της Εξίσωσης 2.27 γίνεται ιδιαίτερα μικρότερος σε σχέση με τον δεύτερο. Σε αυτή την περίπτωση, οι επικρατούντες όροι είναι ίδιοι με αυτούς της μεθόδου Euler για την επίλυση ODE. Έτσι όπως σημειώνεται στην [42], υπάρχει μία σύνδεση μεταξύ του SSA και της Ντετερμινιστικής Προσομοίωσης μέσω ODEs η οποία έχει τα εξής στάδια:

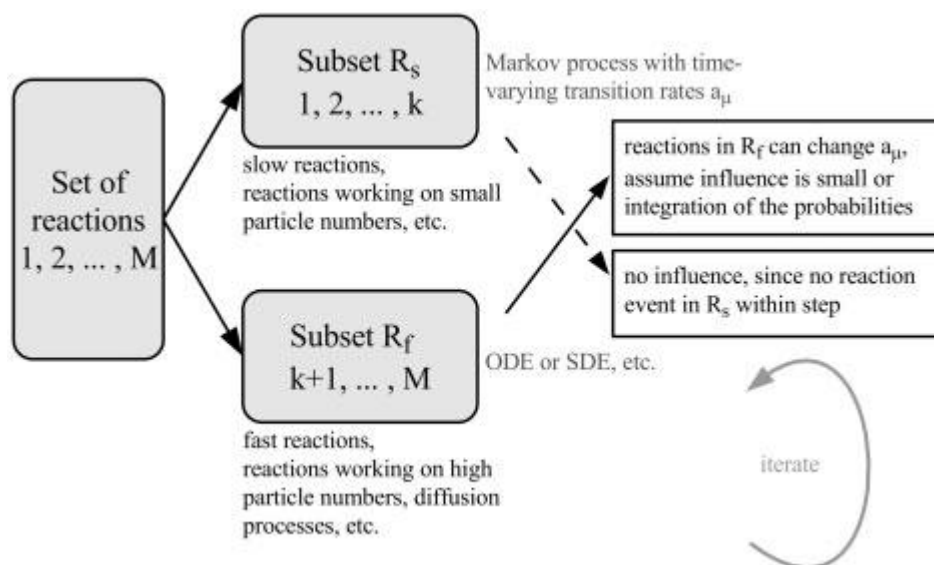


Σχήμα 2.5 Η σχέση μεταξύ των διαφόρων μεθόδων προσομοίωσης

2.3.3 Υβριδική Προσομοίωση

Όπως προαναφέρθηκε, οι εναλλακτικές μέθοδοι προσομοίωσης, έχουν ως στόχο τον συνδυασμό των πλεονεκτημάτων της Ντετερμινιστικής και της Στοχαστικής Προσομοίωσης. Σε αντίθεση με τον Tau-Leaping αλλά και την μέθοδο Langevin, οι οποίες τροποποιούν σε σημαντικό βαθμό την μέθοδο με την οποία προσομοιώνεται η πραγματοποίηση των αντιδράσεων, έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία (αλλά και εφαρμόζονται στην πράξη ακόμα και από εργαλεία όπως το COPASI) οι Υβριδικοί Αλγόριθμοι, κατά τους οποίους χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα αυτούσιοι οι αλγόριθμοι Ντετερμινιστικής και Στοχαστικής Προσομοίωσης (ωστόσο μπορούν να γίνουν και άλλου τύπου συνδυασμοί όπως συνδυασμός προσομοίωσης με SDE με την προσομοίωση μέσω του SSA).

Για να εφαρμοστεί η φιλοσοφία αυτή, θα πρέπει το σύστημα που επιθυμούμε να προσομοιώσουμε να διαχωριστεί σε δύο τμήματα, έτσι ώστε κάθε προσέγγιση προσομοίωσης να αναλάβει την προσομοίωση ενός από αυτά. Ο πλέον συνηθισμένος διαχωρισμός αφορά στο διαχωρισμό γρήγορων και αργών αντιδράσεων. Οι γρήγορες αντιδράσεις συνήθως αφορούν σε αντιδράσεις που εμπλέκονται οντότητες με υψηλά επίπεδα (όπως π.χ. στον μεταβολισμό) ενώ οι αργές αντιδράσεις σε αντιδράσεις με μικρά επίπεδα οντοτήτων (όπως στην σηματοδότηση ή την έκφραση γονιδίων). Στο ακόλουθο σχήμα δίνεται η γενικότερη φιλοσοφία αυτής της κατηγορίας αλγορίθμων:



Σχήμα 2.6 Η φιλοσοφία των υβριδικών αλγορίθμων προσομοίωσης [42]

Μία λεπτομερής περιγραφή των διαφόρων προσεγγίσεων για τους υβριδικούς αλγορίθμους, ξεφεύγει από τα πλαίσια της παρούσας εργασίας, ενώ δεδομένων των αρκετών ανοιχτών ζητημάτων που παρουσιάζονται ακόμα για αυτούς, δεν υπάρχουν κάποιες συγκεκριμένες μέθοδοι που θα μπορούσαν να περιγραφούν, ως πληρέστερες, αντί άλλων. Τα ανοιχτά ζητήματα αλλά και οι μέχρι σήμερα προταθείσες μέθοδοι παρουσιάζονται στην [42].

2.4 Ανάλυση και Εκπαίδευση Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων

Έχοντας πλέον ορίσει σε μαθηματικό πλαίσιο τα Δίκτυα Βιοχημικών Αντιδράσεων, μπορούμε να εκμεταλλευτούμε ένα μεγάλο φάσμα μαθηματικών εργαλείων έτσι ώστε να πραγματοποιήσουμε διαδικασίες ανάλυσης της δομής και της δυναμικής συμπεριφοράς αυτών. Επίσης, ιδιαίτερα σημαντικό κέρδος δίνεται από την δυνατότητα να εκπαιδεύουν τα Δίκτυα Βιοχημικών Αντιδράσεων έτσι ώστε να παρουσιάζουν συμπεριφορά που μπορεί να ταυτιστεί με την διαθέσιμη ποιοτική και ποσοτική γνώση που προέρχεται από το πραγματικό σύστημα. Στις ακόλουθες ενότητες, περιγράφονται οι σημαντικότερες διαδικασίες ανάλυσης των Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων καθώς και η διαδικασία Εκπαίδευσης αυτών η οποία αποτελεί κεντρική διαδικασία για την δημιουργία ενός έγκυρου μοντέλου.

2.4.1 Μέθοδοι Ανάλυσης Βιοχημικών Δικτύων

2.4.1.1 Ανάλυση Ευαισθησίας

Όπως παρουσιάστηκε στις προηγούμενες ενότητες, ένα μοντέλο Συστημικής Βιολογίας, όπως τα Δίκτυα Βιοχημικών Αντιδράσεων, απαρτίζονται από έναν αριθμό παραμέτρων (σταθερές αντιδράσεων, αρχικά επίπεδα οντοτήτων κ.λπ). Σε πολλές περιπτώσεις οι ακριβείς τιμές αυτών των παραμέτρων δεν είναι γνωστές ενώ επίσης δεν είναι γνωστή και η επιρροή που έχει κάθε μία από αυτές στην συμπεριφορά του συστήματος. Η μέθοδος Ανάλυσης Ευαισθησίας, έχει ως στόχο ακριβώς αυτού του βαθμού επιρροής κάθε παραμέτρου στην συμπεριφορά του συστήματος. Κάτι τέτοιο μπορεί να φανεί χρήσιμο για διάφορους λόγους μερικοί εκ των οποίων είναι:

- Σε πολλές περιπτώσεις, οι τιμές αρκετών παραμέτρων είναι άγνωστες, ενώ επίσης η εργαστηριακή τους μέτρηση μπορεί να είναι άμεση αλλά μέχρι και αρκετά δύσκολη. Χρησιμοποιώντας την ανάλυση ευαισθησίας, μπορούμε να πληροφορηθούμε για το αν είναι σημαντικό να γνωρίζουμε/βρούμε την ακριβή τιμή μιας παραμέτρου ή αν μία πιο προσεγγιστική τιμή της αρκεί για τις ανάγκες της μοντελοποίησης. Έτσι μπορούν να αποφασιστούν νέα εργαστηριακά πειράματα αλλά και να ιεραρχηθούν ως προς την κρισιμότητά τους.
- Δεδομένου του στόχου των Μεθόδων Συστημικής Βιολογίας να συνδράμουν στην βιολογική έρευνα, αν στόχος αποτελεί η αλλαγή της συμπεριφοράς ενός συστήματος (παραδείγματος χάριν μέσω ενός φαρμάκου), τότε η ανάλυση ευαισθησίας μπορεί να υποδείξει τους πλέον σημαντικούς παράγοντες για να γίνει η σχετική επέμβαση.
- Η ευρωστία (robustness) των βιολογικών συστημάτων σχετικά με εξωτερικού παράγοντες και επιρροές είναι ιδιαίτερο χαρακτηριστικό τους, δεδομένου ότι οι ζώντες οργανισμοί καλούνται να αντιμετωπίσουν ένα μεγάλο φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Κάτι τέτοιο σημαίνει ότι οι βιολογικές διαδικασίες θα πρέπει να παρουσιάζουν σχετικά μειωμένη ευαισθησία στις αλλαγές παραμέτρων. Από την άλλη όμως, οι οργανισμοί θα πρέπει να αντιδρούν και στο περιβάλλον, έτσι κάποιες άλλες διαδικασίες θα πρέπει να είναι ευαίσθητες στις εξωτερικές επιρροές. Οπότε, η ευρωστία, ή η απουσία της, είναι βασικό

χαρακτηριστικό των βιολογικών συστημάτων και η ανάλυση ευαισθησίας μπορεί να συμβάλει και στην εξακρίβωση αυτών αλλά και στην κατάλληλη ρύθμιση ενός υπολογιστικού μοντέλου ώστε να αποκτήσει αυτά τα χαρακτηριστικά.

Οι μέθοδοι ανάλυσης ευαισθησίας μπορούν να διαχωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες. Τις Μεθόδους Τοπικής Ανάλυσης Ευαισθησίας (Local Sensitivity Analysis) και τις Μεθόδους Ολικής Ανάλυσης Ευαισθησίας (Global Sensitivity Analysis). Ωστόσο, οι Μέθοδοι Τοπικής Ανάλυσης Ευαισθησίας είναι αυτές που μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την σχετική ανάλυση των Συστημάτων ενώ υποστηρίζονται από ένα μεγάλο φάσμα εργαλείων συμπεριλαμβανόμενων των COPASI και SimBiology Toolbox. Έτσι, ακολούθως παρουσιάζονται οι βασικές αρχές των Μεθόδων Τοπικής Ανάλυσης Ευαισθησίας (οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας), ενώ ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης παραπέμπεται στις [46, 47] για τη μελέτη του ζητήματος της Ολικής Ανάλυσης Ευαισθησίας.

Τα δύο βασικότερα πλαίσια πραγματοποίησης της διαδικασίας της Ανάλυσης Ευαισθησίας, είναι Η Ανάλυση Μεταβολικού Ελέγχου (Metabolic Control Analysis/MCA) και οι Γενικές ή Γενικευμένες Ευαισθησίες (Generic/Generalizes Sensitivities). Ωστόσο, οι δύο αυτές κατηγορίες ορίζονται κάτω από το ίδιο μαθηματικό πλαίσιο. Θα πρέπει να σημειωθεί ωστόσο ότι η χρήση της MCA γενικεύτηκε πριν την αντίστοιχη χρήση των Generic Sensitivities (λόγω του πεδίου εφαρμογής της) και έτσι συνηθίζεται ακόμα και για αυτές ο φορμαλισμός να βασίζεται στον αντίστοιχο της MCA ο οποίος δίνεται ακολούθως.

Η ανάλυση Μεταβολικού Ελέγχου είναι μία μέθοδος ποσοτικοποίησης του ελέγχου ή της επιρροής των μεταβολικών μεταβλητών, όπως η συγκέντρωση ενός μεταβολίτη ή ροή μίας σταθερής κατάστασης ενός μεταβολικού συστήματος, από τις παραμέτρους αυτού. Ο έλεγχος αυτό μετριέται μέσω των Συντελεστών Αντίδρασης (Response Coefficients) οι οποίοι ορίζονται ως ο λόγος μεταξύ της σχετικής αλλαγής σε μία μεταβλητή του συστήματος (η αντίδραση αυτού) και της σχετικής αλλαγής στην τροποποιούμενη παράμετρο. Ο ακριβής φορμαλισμός της MCA δίνεται [48] όταν οι response coefficients εκφράζονται ως μερικές παράγωγοι:

$$R_P^Y = \frac{\frac{\partial Y}{Y}}{\frac{\partial P}{P}} = \frac{\partial \ln Y}{\partial \ln P}$$

Εξίσωση 2.28

όπου Y μία μεταβλητή του συστήματος και P η τροποποιούμενη παράμετρος.

Ιδιαίτερα συνηθισμένη εφαρμογή της MCA, είναι η μελέτη του ελέγχου των σταθερών καταστάσεων (steady-state) ροών (fluxes) και των συγκεντρώσεων μεταβολιτών από τις δράσεις των βιοχημικών αντιδράσεων του συστήματος. Σε αυτή την περίπτωση ορίζεται ένα υποσύνολο των response coefficients, οι συντελεστές ελέγχου (control coefficients) οι οποίοι ορίζονται ως εξής:

$$C_v^{[X]ss} = \frac{\partial \ln [X]_{ss}}{\partial \ln v}$$

Εξίσωση 2.29

$$C_v^{Jss} = \frac{\partial \ln J_{ss}}{\partial \ln v}$$

Εξίσωση 2.30

όπου $[X]$ η συγκέντρωση των μεταβολιτών, J η ροή και v ο ρυθμός της αντίδρασης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι control coefficients αποτελούν χαρακτηριστικά του συστήματος και εξαρτώνται από όλα τα μέρη αυτού.

Όσον αφορά τις ιδιότητες ευαισθησίας που αφορούν ένα ένζυμο (βασική μορφή βιομορίων στο μεταβολισμό), οι οποίες καλούνται και «τοπικές»(local) ευαισθησίες οι οποίες είναι κρίσιμες για τον έλεγχο, αυτές είναι οι συντελεστές ελαστικότητας (elasticity coefficients). Μέσω των elasticities, μετράται η σχετική αλλαγή στον ρυθμό μιας ενζυματικής διαδικασίας λόγω μίας σχετικής αλλαγής στα επίπεδα/συγκέντρωση μίας πρωτεΐνης τελεστή (effector protein) [49]. Οι elasticities δίνονται από τον παρακάτω τύπο:

$$\varepsilon_x^v = \frac{\frac{\partial v}{v}}{\frac{\partial x}{x}} = \frac{\partial \ln v}{\partial \ln x}$$

Εξίσωση 2.31

Για την περίπτωση τώρα των Generic Sensitivities, μέσω των οποίων επιθυμούμε να υπολογίσουμε την επιρροή οποιασδήποτε παραμέτρου σε οποιαδήποτε μεταβλητή, χρησιμοποιούνται οι response coefficients (Εξίσωση 2.28). Αφού καθοριστούν οι λίστες των στοιχείων του μοντέλου που θα διαφοριστούν (συναρτήσεις) και των μεταβλητών, πραγματοποιείται αριθμητική διαφορίση (numerical differentiation) μέσω πεπερασμένων διαφορών (finite difference). Η τιμή των διαφορών αυτών επιλέγεται από τον χρήστη της εκάστοτε εφαρμογής.

Θα πρέπει να επισημανθεί ξανά ότι και οι response coefficients αλλά και οι control coefficients και οι elasticities παρέχουν πληροφόρηση μόνο για μικρές αλλαγές του μοντέλου (π.χ. της τάξεως του 5%).

Τέλος, σημειώνεται ότι όλα τα παραπάνω μεγέθη (MCA και generic sensitivities) μπορούν να αποδοθούν είτε κλιμακωτά (scaled) είτε όχι (unscaled). Οι κλιμακούμενες τιμές περιγράφουν ποσοστιαίες αλλαγές, για παράδειγμα η scaled sensitivity τιμής 0.5 σημαίνει ότι αν αυξηθεί η παράμετρος κατά 10% τότε η τιμή στόχος θα αυξηθεί κατά 5% (0.5 φορές το 10%). Στην unscaled περίπτωση, περιγράφονται οι αλλαγές σε απόλυτες τιμές βάσει των μονάδων που περιγράφονται οι διάφορες οντότητες του συστήματος.

Όσον αφορά το λογισμικό COPASI το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της Ανάλυσης Ευαισθησίας κατά τη δημιουργία του προτεινόμενου από την παρούσα εργασία μοντέλου, προσφέρει τον υπολογισμό των sensitivities και στο πλαίσιο του

MCA και στα πλαίσια των generic sensitivities. Ειδικότερα, το συγκεκριμένο λογισμικό επιτρέπει τον υπολογισμό των generic sensitivities και για τις σταθερές καταστάσεις του συστήματος (steady-state) αλλά και για τις χρονοσειρές (time-series) που προκύπτουν από την προσομοίωση αυτού, κάτι που όπως αναφέρεται στην σχετική τεκμηρίωση του εργαλείου, αφορά στην ανάλυση ευαισθησίας για το τελευταίο βήμα της προσομοίωσης (δηλαδή για την κατάσταση που καταλήγει το σύστημα).

2.4.1.2 Άλλες μέθοδοι Ανάλυσης

Εκτός τις ανάλυσης ευαισθησίας, ένας μεγάλος αριθμός μεθόδων ανάλυσης Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων έχει προταθεί στη βιβλιογραφία. Η λεπτομερής παρουσίαση των μεθόδων αυτών ξεφεύγει από τα όρια της παρούσας εργασίας, δεδομένου και ότι δεν χρησιμοποιήθηκε κάποια από αυτές για την δημιουργία του προτεινόμενου μοντέλου, τουλάχιστον στην συγκεκριμένη φάση ανάπτυξής του. Ωστόσο στην ακόλουθη παράγραφο αναφέρονται οι κυριότερες από αυτές, με γνώμονα επιλογής την ευκολία πρόσβασης μέσω των διαφόρων εργαλείων λογισμικού και κυρίως του COPASI μέσω της προσέγγισης του οποίου για αυτές πραγματοποιείται η ακόλουθη παρουσίαση.

Μία ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδος ανάλυσης είναι η Αναζήτηση Παραμέτρων. Μέσω της Αναζήτησης Παραμέτρων, πραγματοποιούνται πολλαπλές προσομοιώσεις ενός μοντέλου με στόχο τη παρατήρηση των διαφορών μεταξύ αυτών. Οι προσομοιώσεις αυτές μπορεί να είναι απλές επαναλήψεις της διαδικασίας προσομοίωσης, με τις ίδιες τιμές παραμέτρων (κάτι ιδιαίτερα χρήσιμο για την περίπτωση της Στοχαστικής Προσομοίωσης) αλλά επίσης μπορούν να αποτελούν και εκτελέσεις με διαφορετικές τιμές παραμέτρων. Οι τιμές των παραμέτρων μπορούν να λαμβάνονται τυχαία από μία κατανομή πιθανότητας για αυτές.

Μία παραπλήσιων στόχων μέθοδος, είναι αυτή του υπολογισμού των εκθετών Lyapunov (Lyapunov exponents) [50]. Οι Lyapunov exponents ενός δυναμικού συστήματος, είναι ποσότητες που χαρακτηρίζουν το ρυθμό διαφοροποίησης μεταξύ δύο απειροστά παρόμοιων ακολουθιών αποτελεσμάτων προσομοίωσης. Λεπτομέρειες για τον τρόπο εφαρμογής στα Δίκτυα Βιοχημικών Αντιδράσεων δίνονται στην [51].

Η μέθοδος Διαχωρισμού μέσω Κλίμακας Χρόνου (Time Scale Separation) αποτελεί μία μέθοδο που συμβάλει στην απλοποίηση των μοντέλων Συστημικής Βιολογίας με στόχο την επιτάχυνση των προσομοιώσεων αλλά και την διαίρεση των Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων σε υπο-μοντέλα, δίνοντας έτσι την δυνατότητα απομονωμένης και αποδοτικότερης ανάλυσης τους. Λεπτομέρειες για την συγκεκριμένη μέθοδο ανάλυσης δίνονται στις [52, 53].

Τέλος, μία ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδος ανάλυσης, που όμως δεν έχει νόημα εφαρμογής σε όλα τα μοντέλα, είναι αυτή του υπολογισμού Σταθερής Κατάστασης (Steady State). Μία σταθερή κατάσταση, αποτελεί η κατάσταση εκεί όπου οι μεταβλητές κατάστασης του μοντέλου για παράδειγμα οι συγκεντρώσεις των οντοτήτων του μοντέλου, δεν αλλάζουν πλέον παρά την εξέλιξη του χρόνου. Λεπτομέρειες για την συγκεκριμένη μέθοδο δίνονται στην [54].

2.4.2 Εκπαίδευση Βιοχημικών Δικτύων-Εκτίμηση Παραμέτρων

Όπως παρουσιάστηκε στις προηγούμενες ενότητες, βασική προϋπόθεση για την δημιουργία ενός πλήρους μοντέλου Συστημικής Βιολογίας, είναι η γνώση των τιμών των παραμέτρων των χημικών αντιδράσεων. Αν και από μόνα τους τα μοντέλα μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικά συμπεράσματα, κυρίως ποιοτικά, η όσο το δυνατόν ακριβέστερη γνώση των συγκεκριμένων παραμέτρων, μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία ενός μοντέλου που θα προσομοιώνει με σημαντική ακρίβεια και ικανοποιητικής αριθμητική προσέγγισης, τα παρατηρούμενα βιολογικά φαινόμενα. Κεντρική οδός για την απόκτηση αυτών των τιμών των παραμέτρων, πέραν της αναζήτησης στη σχετική εργαστηριακή βιβλιογραφία, αποτελεί η διαδικασία εκτίμησης παραμέτρων.

Η διαδικασία εκτίμησης παραμέτρων αναφέρεται σε εκείνη τη διαδικασία όπου δεδομένου ενός Βιοχημικού Δικτύου Συστημικής Βιολογίας και ενός συνόλου εργαστηριακών ποσοτικοποιημένων δεδομένων για κάποιες ή όλες τις οντότητες του μοντέλου, επιχειρείται μέσω υπολογιστικών μεθόδων να υπολογιστούν οι παράμετροι των αντιδράσεων όπως αυτές παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες ενότητες, με στόχο την δημιουργία ενός μοντέλου που οι προσομοιώσεις τους θα επιστρέφουν αποτελέσματα όσο το δυνατόν ομοιότερα με τα διαθέσιμα εργαστηριακά δεδομένα.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όπως και οι αλγόριθμοι Προσομοίωσης, χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, του Ντετερμινιστικούς και του Στοχαστικούς, έτσι και οι διάφορες προσεγγίσεις της διαδικασίας Εκτίμησης Παραμέτρων χωρίζονται σε:

- μεθόδους που είναι κατάλληλες για μοντελοποιήσεις Ντετερμινιστικής προσέγγισης και έχουν ως κυριότερο εργαλείο ορισμού του προβλήματος τις Συνήθεις Διαφορικές Εξισώσεις (ODEs)
- μεθόδους που είναι κατάλληλες για μοντελοποιήσεις Στοχαστικής προσέγγισης με κυριότερο εργαλείο ορισμού του προβλήματος την Chemical Master Equation.

Σε κάθε περίπτωση, ωστόσο, όπως συμβαίνει και με τους αλγορίθμους Προσομοίωσης, η καταλληλότητα της κάθε προσέγγισης εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του κατά περίπτωση μοντέλου, χωρίς να αποκλείεται κατ' ανάγκην η εφαρμογή κάποιας μεθόδους.

Τέλος, θα πρέπει να επισημανθεί ότι ενώ για τον Ντετερμινιστικό χώρο η διαδικασία της εκτίμησης παραμέτρων θεωρείται σε ένα βαθμό ώριμη, για τον Στοχαστικό χώρο, επί του παρόντος, είναι λίγες συγκριτικά οι εργασίες που προτείνουν λύσεις και έτσι δεν θεωρείται διεργασία ρουτίνας [55].

Στις ακόλουθες ενότητες παρουσιάζονται οι κυριότερες προσεγγίσεις που έχουν προταθεί στην πρόσφατη βιβλιογραφία για την διαδικασία της Εκτίμησης Παραμέτρων.

2.4.2.1 Εκτίμηση Παραμέτρων μέσω μεθόδων Βελτιστοποίησης

Η Εκτίμηση Παραμέτρων Βιοχημικών Δικτύων μέσω μεθόδων Βελτιστοποίησης αποτελεί την πλέον διαδεδομένη πρακτική για την συγκεκριμένη διαδικασία. Ουσιαστικά αποτέλεσε την πρώτη μορφή Εκτίμησης Παραμέτρων ενώ λόγω της γενικότητάς της, όπως θα παρουσιαστεί ακολούθως, μπορεί συνεχώς να εξελίσσεται όσο εξελίσσεται το πεδίο των Μεθόδων Βελτιστοποίησης. Στις παρακάτω ενότητες δίνεται το θεωρητικό πλαίσιο της εφαρμογής των μεθόδων αυτών στην Εκτίμηση Παραμέτρων ενώ επίσης παρουσιάζονται οι κυριότερες μέθοδοι που έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία αλλά και σημαντικά συμπεράσματα από την βιβλιογραφία.

2.4.2.1.1 Θεωρητικό Πλαίσιο Εκτίμησης Παραμέτρων μέσω Μεθόδων Βελτιστοποίησης

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα συστήματα (Βιοχημικά Δίκτυα) των οποίων τις παραμέτρους θέλουμε να εκτιμήσουμε, χρησιμοποιώντας διαθέσιμα εργαστηριακά δεδομένα, είναι μη γραμμικά. Στα πλαίσια των Μεθόδων Βελτιστοποίησης το πρόβλημα ορίζεται ως Πρόβλημα Μη-Γραμμικού Προγραμματισμού (NLP) με διαφορικούς-αλγεβρικούς περιορισμούς (DAEs). Οι περιορισμοί εξάγονται από τις Διαφορικές Εξισώσεις που περιγράφουν το σύστημα, όπως παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες ενότητες. Επίσης, ανάλογα με τις ανάγκες του προβλήματος εκτίμησης παραμέτρων, μπορούν να οριστούν και άλλοι αλγεβρικοί περιορισμοί, πρακτική που ακολουθείται και στα πλαίσια της παρούσας εργασίας για την ανάπτυξη του προταθέντος μοντέλου.

Στον πλήρη ορισμό του προβλήματος της Εκτίμησης Παραμέτρων μέσω Μεθόδων Βελτιστοποίησης, αναζητούμε τις τιμές ενός συνόλου παραμέτρων θ , ώστε να ελαχιστοποιείται η παρακάτω συνάρτηση κόστους:

$$J = \int_0^{t_f} \left(y_{exp}(t) - y_{sim}(\theta, t) \right)^T W(t) (y_{exp}(t) - y_{sim}(\theta, t))$$

Εξίσωση 2.32

Η παραπάνω συνάρτηση κόστους υπόκειται στους παρακάτω περιορισμούς:

- $f\left(\frac{dx}{dt}, x, y, \theta, v, t\right) = 0$
- $x(t_0) = x_0$
- $h(x, y, \theta, v) = 0$
- $g(x, y, \theta, v) \leq 0$
- $\theta_{limit} \leq \theta \leq \theta_{limit}$

Όπου:

- θ : Διάνυσμα Παραμέτρων – μεταβλητές προβλήματος βελτιστοποίησης
- $W(t)$: Πίνακας βαρών

- x : Οι μεταβλητές κατάστασης του Συστήματος (συγκεντρώσεις-αριθμός μορίων)
- v : Διάνυσμα με παραμέτρους που δεν εκτιμούνται και συνήθως δεν διαφοροποιούνται στο χρόνο
- f : Το σύνολο των περιορισμών που περιγράφουν τη δυναμική του Συστήματος
- h, g : Πιθανοί περιορισμοί που περιγράφουν πρόσθετα χαρακτηριστικά του Συστήματος

Στην πράξη (π.χ. στο εργαλείο COPASI) η συνάρτηση κόστους λαμβάνει την παρακάτω μορφή αθροίσματος τετραγώνων με βάρη:

$$J = \sum_{i,j} w_j \left(y_{exp_{i,j}} - y_{sim_{i,j}}(\theta) \right)^2$$

Εξίσωση 2.33

Όπου με i συμβολίζονται οι γραμμές του συνόλου δεδομένων (συνήθως χρονικές στιγμές) και με j οι στήλες (διαφορετικές οντότητες του Συστήματος).

Με w_j συμβολίζονται τα βάρη που χρησιμοποιούνται για κάθε στήλη (οντότητα) του συνόλου δεδομένων. Οι πιο συνήθεις τρόποι υπολογισμού αυτών των βαρών (που υιοθετούνται και στο COPASI) είναι:

- Mean: $w_j = \frac{1}{|<x_j>|}$
- Mean Square: $w_j = \frac{1}{\sqrt{<x_j^2>}}$
- Standard Deviation $w_j = \frac{1}{<x_j^2> - <x_j><x_j>}$

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για κάθε ένα διαφορετικό εργαστηριακό πείραμα (αν υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα πολλαπλών πειραμάτων για το ίδιο σύστημα), υπολογίζεται η τιμή του παραπάνω αθροίσματος ξεχωριστά για κάθε πείραμα και η τελική τιμή της συνάρτησης κόστους υπολογίζεται από το άθροισμα των επιμέρους. Επίσης, τα βάρη κλιμακώνονται έτσι ώστε για κάθε πείραμα το μέγιστο βάρος να είναι 1.

2.4.2.1.2 Καταλληλότητα Εφαρμογής μεθόδων Βελτιστοποίησης και Κυριότερες Μέθοδοι

Όπως προαναφέρθηκε, τα μοντέλα Συστημικής Βιολογίας είναι στην γενική περίπτωση μη-γραμμικά και περιέχουν περιορισμούς. Έτσι, το πρόβλημα Εκτίμησης Παραμέτρων είναι συχνά πολυτροπικό (multimodal) ή μη-κυρτό (nonconvex) πρόβλημα Βελτιστοποίησης (δηλαδή η συνάρτηση κόστους μπορεί να παρουσιάζει πολλαπλά τοπικά ελάχιστα). Έτσι, οι κλασσικές μέθοδοι τοπικής αναζήτησης (ακόμα και αυτές που ακολουθούν τυχαίες επανεκκινήσεις), δεν μπορούν να εγγυηθούν την εύρεση του ολικού ελαχίστου αλλά μπορούν να αποδειχθούν και μη αποδοτικές λόγω επανάληψης

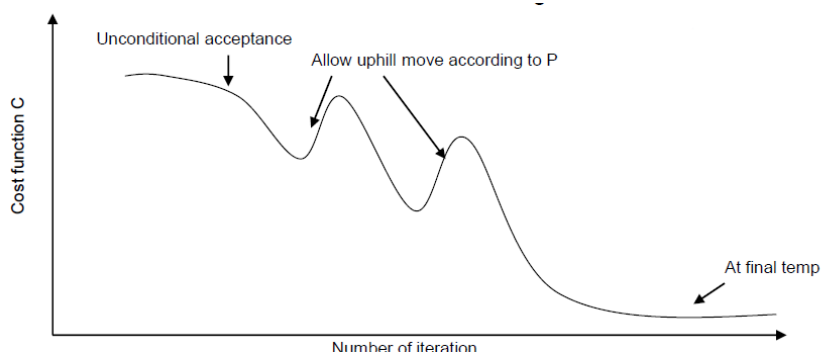
των ίδιων σεναρίων. Έτσι, στα συγκεκριμένα προβλήματα, ακολουθούνται μέθοδοι Ολικής Βελτιστοποίησης (Global Optimization-GO) [56].

Οι Μέθοδοι Ολικής Βελτιστοποίησης μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες:

- **Ντετερμινιστικές Μέθοδοι:** Μπορούν να εγγυηθούν την εύρεση ολικού ελαχίστου και για προβλήματα Μη-Γραμμικών Δυναμικών Συστημάτων, ωστόσο παρουσιάζουν ιδιαίτερα υψηλές απαιτήσεις σε χρόνο.
- **Στοχαστικές Μέθοδοι:** Επειδή βασίζονται σε πιθανοτικές προσεγγίσεις δεν εγγυώνται την εύρεση του Ολικού Ελάχιστου ωστόσο μπορούν να εντοπίσουν την περιοχή όπου αυτό βρίσκεται ιδιαίτερα αποδοτικά. Γι' αυτό το λόγο είναι οι κύριες μέθοδοι Βελτιστοποίησης που χρησιμοποιούνται στην Εκτίμηση Παραμέτρων Βιοχημικών Δικτύων [57].

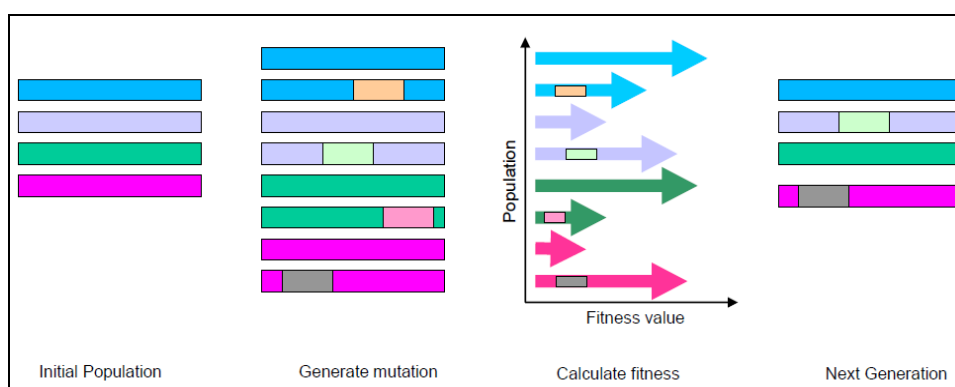
Με βάση τα συμπεράσματα που δίνονται στις [57, 58] (εργασίες στις οποίες παραπέμπεται ο αναγνώστης για περαιτέρω λεπτομέρειες και αναφορές), ακολούθως παρουσιάζονται, εν συντομία, οι κυριότερες και πλέον διαδεδομένες Στοχαστικές Μέθοδοι Ολικής Βελτιστοποίησης οι οποίες είναι:

- **Adaptive Stochastic Methods (ή adaptive random search):** Βασίζεται στην απλούστερη μορφή Στοχαστικής Βελτιστοποίησης, την Τυχαία Αναζήτηση (Random Search), ωστόσο εστιάζει την αναζήτηση στην περιοχή όπου έχει βρεθεί η μέχρι τώρα καλύτερη λύση.
- **Clustering Methods:** Μέθοδοι που βασίζονται στην ιδέα των τυχαίων επανεκκινήσεων από διαφορετικές αρχικές καταστάσεις. Ωστόσο προσπαθούν να εντοπίσουν τις περιοχές κοντά στο τοπικό βέλτιστο και έτσι να αποφύγουν την πολλαπλή εύρεση των ίδιων τοπικών βέλτιστων.
- **Simulated Annealing (SA):** Μέθοδος εμπνευσμένη από την διαδικασία της ανόπτησης στην μεταλλουργία. Επιτρέπει να πραγματοποιούνται κινήσεις που δεν βελτιώνουν τη λύση πάντα ώστε να αποφεύγεται ο εγκλωβισμός σε τοπικά βέλτιστα. Η πιθανότητα αποδοχής τέτοιου είδους κίνησης μειώνεται συνεχώς (ανάλογο της θερμοκρασίας). Στο ακόλουθο σχήμα δίνεται ένα παράδειγμα εκτέλεσης του συγκεκριμένου αλγορίθμου.



Σχήμα 2.7 Παράδειγμα εκτέλεσης του αλγορίθμου Simulated Annealing

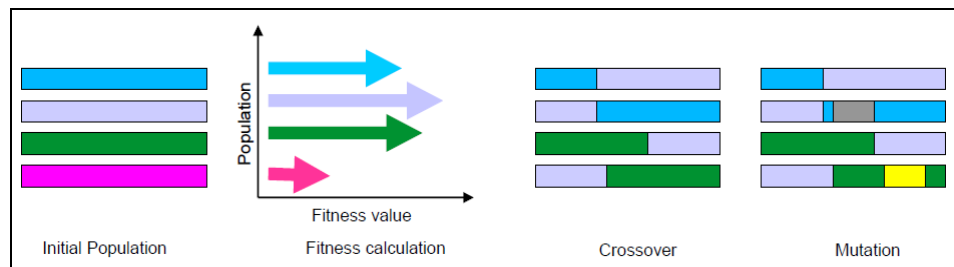
- **Evolutionary Computation (EC):** Μέθοδοι που βασίζονται στην ιδέα της βιολογικής εξέλιξης μέσω των μηχανισμών αναπαραγωγής και μετάλλαξης και του δόγματος της επιβίωσης του ισχυρότερου. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι βρίσκουν συνεχώς καλύτερες λύσεις, δημιουργώντας νέες γενιές. Ακολούθως παρουσιάζονται οι βασικότεροι αλγόριθμοι αυτής της κατηγορίας έχοντας ως βάση την παρουσίαση που δίνεται στα συνοδευτικά κείμενα του λογισμικού COPASI [59].
 - **Evolutionary Programming (EP):** υπολογιστική τεχνική που μιμείται την εξέλιξη και βασίζεται στην αναπαραγωγή και την επιλογή. Μία εκτέλεση του αλγορίθμου αποτελείται από οντότητες που αναπαράγονται και ανταγωνίζονται. Κάθε μία αποτελεί μια πιθανή λύση για το πρόβλημα της βελτιστοποίησης και εκπροσωπείται από ένα «γονιδίωμα», όπου κάθε γονίδιο αντιστοιχεί σε μία από τις ρυθμιζόμενες παραμέτρους. Σε κάθε γενιά της εκτέλεσης του EP, κάθε οντότητα αναπαράγεται, δηλαδή διαιρείται σε δύο νέες οντότητες. Η μία από αυτές περιέχει ακριβώς το ίδιο «γονιδίωμα» με την οντότητα γονέα, ενώ η άλλη επιδέχεται κάποιες μεταλλάξεις (μικρές αλλαγές στις τιμές παραμέτρων). Στο τέλος κάθε γενιάς, ο αλγόριθμος έχει διπλασιάσει τον αριθμό των οντοτήτων. Στη συνέχεια, κάθε μία από τις οντότητες συγκρίνεται με μία σειρά άλλων για τον υπολογισμό των νικών της. Ο αριθμός των νικών είναι ο αριθμός των ανταγωνιστών αυτών που αντιπροσωπεύουν χειρότερες λύσεις από ότι η ίδια. Όλες οι οντότητες βαθμολογούνται ανάλογα με τον αριθμό των νικών τους, και ο πληθυσμός μειώνεται και πάλι στον αρχικό αριθμό οντοτήτων, με την εξάλειψη εκείνων που αντιπροσωπεύουν τις χειρότερες λύσεις. Ακολούθως δίνεται ένα γραφικό παράδειγμα της φιλοσοφίας του αλγορίθμου:



Σχήμα 2.8 Η φιλοσοφία του αλγορίθμου Evolutionary Programming [57]

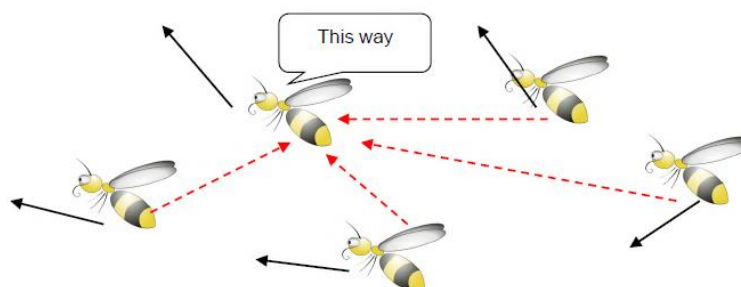
- **Evolutionary Strategy (SRES):** Αλγόριθμος παρόμοιο με τον EP. Ωστόσο, κάθε γονέας δημιουργεί πολλαπλούς απογόνους σε κάθε γενιά και κάθε απόγονος περιέχει ένα συνδυασμό γονιδίων που προέρχονται και από άλλο γονέα αλλά και από μεταλλάξεις.

- **Genetic Algorithm (GA):** Αλγόριθμος ο οποίος είναι σε μεγάλο βαθμό παρόμοιος με τον ΕΡ, ωστόσο διαφέρουν στο ότι ο GA χρησιμοποιεί εκτός από τις μεταλλάξεις και τον συνδυασμό (Crossover) του «γονιδιώματος» δύο γονέων για την παραγωγή των νέων οντοτήτων. Στο ακόλουθο σχήμα δίνεται μία συνοπτική περιγραφή των βημάτων του αλγορίθμου.



Σχήμα 2.9 Η φιλοσοφία του αλγορίθμου Genetic Algorithm [57]

- **Genetic Algorithm with Stochastic Ranking (GASR):** Αλγόριθμος σχεδόν ταυτόσημος με τον Genetic Algorithm, διαφέρει ωστόσο σε κάποια δομικά σημεία, όπως ο τρόπος που δημιουργούνται οι μεταλλάξεις αλλά και η μέθοδος που γίνεται η επιλογή, όπου στην συγκεκριμένη περίπτωση γίνεται μέσω μίας bubble sort διαδικασίας που χρησιμοποιεί τυχαίους παράγοντες.
- **Particle Swarm (PS):** Εμπνευσμένος από τον τρόπο που ένα σμήνος πουλιών ή ένα κοπάδι ψαριών αναζητούν τροφή. Κάθε μέλος της ομάδας αποτελεί ένα σωματίδιο (Particle). Κάθε σωματίδιο χαρακτηρίζεται από μία θέση X_i και από μία ταχύτητα U_i στον χώρο των παραμέτρων. Επιπλέον, κάθε σωματίδιο, αποθηκεύει την καλύτερη τιμή της χαρακτηριστικής συνάρτησης που έχει επιτύχει και την θέση στην οποία την επέτυχε. Με βάση τώρα την γνώση κάθε σωματίδιο αλλά και την θέση των γειτόνων του (ένα τυχαίο υποσύνολο αυτών), υπολογίζεται κάθε φορά η νέα ταχύτητα του σωματιδίου και κατ' αυτό τον τρόπο κινείται προς την νέα θέση στο χώρο παραμέτρων. Ακολουθώντας δίνεται μία γραφική αναπαράσταση την ιδέα που διέπει τον Particle Swarm.



Εικόνα 2.6 Αναπαράσταση της κεντρικής ιδέας του αλγορίθμου Particle Swarm [57]

2.4.2.1.3 Συμπεράσματα από τη Βιβλιογραφία, Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα των μεθόδων Βελτιστοποίησης

Βάσει των όσων παρουσιάστηκαν προηγουμένως, όσον αφορά την εφαρμογή των Μεθόδων Βελτιστοποίησης στην Εκτίμηση Παραμέτρων Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων, μπορούν να εξαχθούν κάποια βασικά Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα τα οποία παρατίθενται ακολούθως:

- Πλεονεκτήματα
 - Αποτελούν ιδιαίτερα μελετημένες μεθόδους με εφαρμογές σε διάφορους τομείς και πλούσια βιβλιογραφία.
 - Υλοποιούνται σε μεγάλο αριθμό γενικών αλλά και εξειδικευμένων εργαλείων (π.χ. COPASI)
 - Δεν επηρεάζονται από τις λεπτομέρειες του Βιολογικού-Βιοχημικού Συστήματος
 - Δεν επεμβαίνουν στην επιλογή αλγορίθμου προσομοίωσης του Συστήματος, αν και στην πραγματικότητα απαιτούν τη χρήση Ντετερμινιστικών αλγορίθμων ώστε να είναι ισοδύναμες οι συγκρίσεις μεταξύ των επαναλήψεων (λόγω της αβεβαιότητας στα αποτελέσματα των Στοχαστικών Αλγορίθμων).
- Μειονεκτήματα
 - Ανάλογα με την επιλογή αλγορίθμου Βελτιστοποίησης, αναζητούν λίγο έως πολύ εξαντλητικά τον χώρο των παραμέτρων (πιθανούς συνδυασμούς τιμών για το διάνυσμα θ)
 - Σε πολλές περιπτώσεις έχουν υψηλές απαιτήσεις υπολογιστικών πόρων [60]
 - Δεν παρουσιάζουν καλά αποτελέσματα όταν ο θόρυβος μέτρησης (κατά τη δημιουργία του συνόλου εργαστηριακών δεδομένων) είναι σημαντικός [60]
 - Στον ορισμό της Συνάρτησης Κόστους δεν ενσωματώνεται ο πιθανός Θόρυβος των Μετρήσεων αλλά και ο Εσωτερικός Θόρυβος του Συστήματος

Παρόλα τα μειονεκτήματά τους, ωστόσο, αποτελούν την αμεσότερη μέθοδο Εκτίμησης Παραμέτρων και λόγω της διαθεσιμότητας του σε διάφορα εργαλεία αποτελούν μία άμεση λύση, τουλάχιστον για τις πρώτες προσπάθειες εκτίμησης παραμέτρων σε ένα υπό δημιουργία μοντέλο. Ωστόσο, στην βιβλιογραφία έχει προταθεί ένα μεγάλος αριθμός εναλλακτικών μεθόδων για την εκτίμηση παραμέτρων, αντιπροσωπευτικά και κυριότερα δείγματα των οποίων παρουσιάζονται, εν συντομία, στην ακόλουθη ενότητα.

Όσον αφορά τη σύγκριση των διαφόρων αλγορίθμων Βελτιστοποίησης, αν και σίγουρα τα αποτελέσματά τους εξαρτώνται και από το πρόβλημα στο οποίο εφαρμόζονται, μία εικόνα για τα χαρακτηριστικά απόδοσης των αλγορίθμων EP,GA,SA και PSO μπορεί να

σχηματιστεί από τα αποτελέσματα που δίνονται στην [57]. Στην συγκεκριμένη εργασία εκτιμούνται 4 παράμετροι από μοντέλο 15 παραμέτρων και τα συμπεράσματα είναι ότι την καλύτερη ακρίβεια στην εκτίμηση παραμέτρων πετυχαίνει ο PS αλλά ο χρόνος που απαιτεί είναι σχεδόν πενταπλάσιος αυτού που απαιτείται από τους EP και GA. Τέλος, αν και ο SA καταφέρνει να βρεθεί σε μία περιοχή παραμέτρων ιδιαίτερα κοντά στις πραγματικές σε πάρα πολύ γρήγορο χρόνο, χρειάζεται τον περισσότερο χρόνο από όλους τους δοκιμαζόμενους αλγορίθμους ώστε να ολοκληρώσει την διαδικασία εκτίμησης παραμέτρων. Με βάση αυτά τα συμπεράσματα, όπως και αντίστοιχα που δίνονται σε άλλες εργασίες όπως η [58], έγιναν οι επιλογές αλγορίθμων εκτίμησης παραμέτρων για την εκπαίδευση του μοντέλου που δημιουργήθηκε στα πλαίσια της εργασίας και περιγράφεται με λεπτομέρεια στα Κεφάλαια 3,4 και 5.

2.4.2.2 Εναλλακτικές μέθοδοι Εκτίμησης Παραμέτρων

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η εκτίμηση παραμέτρων μέσω Μεθόδων Βελτιστοποίησης, παρουσιάζει κάποια σημαντικά μειονεκτήματα. Λύση στα μειονεκτήματα αυτά έρχονται να δώσουν πιο εξεζητημένες μέθοδοι εκτίμησης παραμέτρων οι οποίες συνεχώς αυξάνονται σε αριθμό στη σχετική βιβλιογραφία. Οι συγκεκριμένες μέθοδοι βασίζονται σε αλγορίθμους και μεθόδους που αναπτύχθηκαν στο χώρο της Μηχανικής Μάθησης και του Αυτομάτου Ελέγχου, οι οποίοι, βέβαια, αποτελούν συγγενικούς χώρους. Ειδικότερα, όσον αφορά τις μεθόδους Μηχανικής Μάθησης, οι κυριότερες μέθοδοι που έχουν προταθεί στην πρόσφατη βιβλιογραφία μπορούν να ομαδοποιηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες, αυτές που για την εκτίμηση των παραμέτρων βασίζονται στην Μεγιστοποίηση της Πιθανοφάνειας (Likelihood) [61] και αυτές που χρησιμοποιούν τις αρχές της Bayesian Στατιστικής [62] και της σχετικής μεθοδολογίας Συμπερασμού (Inference) [63]. Από τις μεθόδους Αυτομάτου Ελέγχου, οι σχετικές εφαρμογές αναφέρονται στην χρήση των Kalman Filter [64] και των Particle Filter [65], οι οποίες ωστόσο παρουσιάζουν αρκετά κοινά στη φιλοσοφία του σε σχέση με τις Bayesian μεθόδους.

Στα πλαίσια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε μία ευρεία ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που αφορά την εφαρμογή των παραπάνω κατηγοριών μεθόδων στην Εκτίμηση Παραμέτρων Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων. Επειδή, όμως, οι συγκεκριμένες μέθοδοι, επί του παρόντος, δεν έχουν δοκιμαστεί ευρέως και δεν έχουν διαδοθεί σημαντικά στην κοινότητα της Συστημικής Βιολογίας, δεν επιλέχθηκε η εφαρμογή τους, στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του προτεινόμενου μοντέλου. Έτσι η παρουσίαση της συγκεκριμένης ανασκόπησης (η οποία βάσει της διαθέσιμης γνώσης δεν έχει παρουσιαστεί ξανά στην ελληνική γλώσσα), δίνεται στο Παράρτημα I, ενώ στην ακόλουθη υποενότητα, δίνονται τα γενικότερα συμπεράσματα αυτής. Σε κάθε περίπτωση, ωστόσο, η αξιοποίηση των συγκεκριμένων μεθόδων αποτελεί μελλοντικό στόχο της εργασίας, όπως περιγράφεται και στο σχετικό Κεφάλαιο, με στόχο την αναζήτηση όλων των περιθωρίων βελτίωσης του μοντέλου.

2.4.2.3 Συμπεράσματα ανασκόπησης μεθόδων Εκτίμησης Παραμέτρων

Στις παραπάνω ενότητες, παρουσιάστηκαν οι πλέον αντιπροσωπευτικές και οι πιο διαδεδομένες προσεγγίσεις του προβλήματος της Εκτίμησης Παραμέτρων Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων. Για την εξαγωγή συμπερασμάτων, θα πρέπει να συνεκτιμήσουμε την υφιστάμενη κατάσταση γύρω από την Μοντελοποίηση και την Προσομοίωση Βιοχημικών Δικτύων, την διαθεσιμότητα και την μορφή των διαθέσιμων δεδομένων αλλά και την καταλληλότητα εφαρμογής των διαφόρων μεθόδων.

Στις μέρες μας η εξέλιξη στις μεθόδους Βιοτεχνολογίας έχει δώσει τη δυνατότητα σε πολλές περιπτώσεις οι διαθέσιμες μετρήσεις να αναφέρονται στο επίπεδο του ενός κυττάρου. Επίσης ο ρυθμός παραγωγής δεδομένων έχει αυξηθεί ραγδαία ενώ το αντίστοιχος κόστος έχει μειωθεί αντιστοίχως. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις τα λαμβανόμενα δεδομένα είναι ελλιπή. Συνεχίζοντας, όσον αφορά τις ανάγκες χρήσης Στοχαστικής προσέγγισης για την μοντελοποίηση και προσομοίωση των βιολογικών φαινομένων, αυτή καθίσταται όλο και περισσότερο πιο αναγκαία λόγω και της διαθεσιμότητας λεπτομερών δεδομένων όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Με βάση τα παραπάνω εξάγονται τα ακόλουθα συμπεράσματα για κάθε κατηγορία.

Μέθοδοι Βελτιστοποίησης: παρότι χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία επί δεκαετίες και σε πολλά διαφορετικά συστήματα, όσον αφορά το μέγεθος και την φύση, παρουσιάζουν τα εξής αρνητικά σημεία:

- Παρουσιάζονται σε πολλές περιπτώσεις ιδιαίτερα απαιτητικές σε πόρους μιας και λίγο έως πολύ εξερευνούν όλο το διαθέσιμο χώρο παραμέτρων. Ωστόσο αν γνωρίζουμε την περιοχή όπου κινούνται οι τιμές των παραμέτρων, ο χώρος αναζητήσεων μπορεί να μειωθεί δραστικά.
- Δεν αποδίδουν καλά σε περιπτώσεις όπου ο θόρυβος μετρήσεων είναι υψηλός [60]
- Δεν μπορούν να αξιοποιήσουν δεδομένα από συστήματα που εμφανίζουν εγγενή θόρυβο και έτσι χρίζουν Στοχαστικής Προσομοίωσης [66]

Μέθοδοι ML: δημιουργείται το κατάλληλο πλαίσιο ώστε να χρησιμοποιηθεί η Στοχαστική Μοντελοποίηση στην εκτίμηση παραμέτρων είτε προσεγγίζοντας την ML είτε εκτιμώντας τη μέσω προσομοιώσεων και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας Μεθόδους Βελτιστοποίησης για την εύρεση των παραμέτρων. Επίσης οι ML μέθοδοι μπορούν να ανταπεξέρθουν σε δεδομένα με Θόρυβο Μετρήσεων που δεν είναι κατ' ανάγκη Λευκός Gaussian [37]. Ωστόσο και εδώ υπάρχουν κάποια αρνητικά σημεία:

- Δεν υπάρχει κάποια προφανής συνάρτηση απόστασης (όπως υπάρχει στις Μεθόδους Βελτιστοποίησης) και έτσι θα πρέπει να δοκιμάζονται διάφορες προτάσεις.
- Οι προτεινόμενες μέθοδοι απαιτούν δεδομένα για όλες τις συμμετέχουσες στο σύστημα οντότητες.

Μέθοδοι Αυτόματου Ελέγχου: Επιτρέπουν την χρήση ενός ιδιαίτερα διαδεδομένου αλγορίθμου, του Kalman Filter, το οποίο πέραν της απόδοσης, προσφέρει και ευκολία

στον ορισμό των προβλημάτων. Η εφαρμογή αυτή θα μπορούσαμε να πούμε ότι παρουσιάζουν τα εξής πλεονεκτήματα:

- Λαμβάνει υπόψη της τον εγγενή Θόρυβο του Συστήματος αλλά και τον Θόρυβο Μετρήσεων
- Μπορεί να αξιοποιήσει ελλιπή δεδομένα ορίζοντας συνάρτηση που περιγράφει την σχέση των μετρήσεων με τις οντότητες του Συστήματος

Ως μειονεκτήματα των μέχρι τώρα προτεινόμενων εφαρμογών μπορούν να προσμετρηθούν:

- Η απουσία κάποιας μεθόδου που κάνει χρήση της ακριβούς Στοχαστικής Προσομοίωσης
- Σε όλες τις εργασίες γίνεται παραδοχή Λευκού θορύβου κάτι που στην πραγματικότητα μπορεί να μην ισχύει [67]
- Επίσης, ο Θόρυβος Συστήματος και ο Θόρυβος Μετρήσεων θεωρούνται ανεξάρτητοι κάτι που πάλι μπορεί να μην ισχύει [67]
- Τέλος, η τεχνική επέκτασης καταστάσεων αλλά και γενικότερα η φύση των Kalman Filter όταν εφαρμόζονται σε μη-γραμμικά προβλήματα μπορεί να οδηγήσει σε μη αξιόπιστα αποτελέσματα λόγω των αναγκαστικών προσεγγιστικών μεθόδων, όπως παρουσιάστηκαν παραπάνω

Bayesian Μέθοδοι: έρχονται να επιλύσουν πολλά από τα παραπάνω προβλήματα, όντας ικανές να λειτουργήσουν σε Στοχαστικά Πλαίσια (ακόμα και ακριβή), να ανταπεξέλθουν των ελλιπών δεδομένων αλλά και του Θορύβου Μετρήσεων και να συνυπολογίσουν τον εγγενή Θόρυβο του Συστήματος χωρίς συγκεκριμένες παραδοχές για αυτόν. Επίσης, σημαντικό πλεονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι ότι εξάγουν την πλήρη κατανομή πιθανοτήτων για τις παραμέτρους και όχι απλά μία σημειακή εκτίμηση. Ωστόσο για τις συγκεκριμένες μεθόδους θα πρέπει να σημειωθεί ότι:

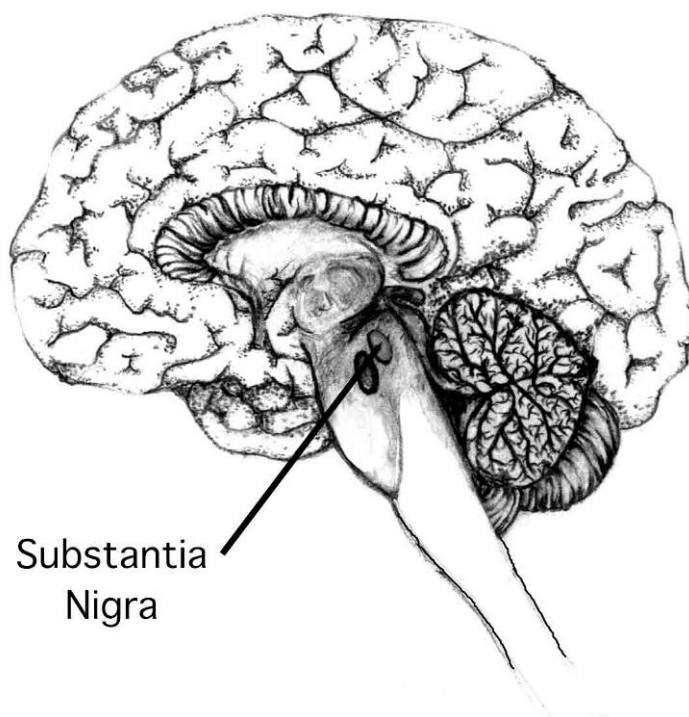
- Καθίστανται πρακτικά ανέφικτες στη χρήση ακριβούς Στοχαστικής Προσομοίωσης λόγω του ιδιαίτερα αυξημένου υπολογιστικού κόστους για προβλήματα ρεαλιστικού μεγέθους (κάτι που αντιμετωπίζεται με την υιοθέτηση προσεγγιστικών μεθόδων όπως η diffusion approximation)[16]
- Απαιτούν την ανάπτυξη και χρήση σύνθετων και απαιτητικών σε υπολογιστικούς πόρους MCMC μεθόδων Προσομοίωσης και Δειγματοληψίας

Έχοντας ολοκληρώσει την παρουσίαση των βασικών μεθόδων της Συστημικής Βιολογίας, στο ακόλουθο Κεφάλαιο παρουσιάζονται οι λεπτομέρειες τους μελετώμενου βιολογικού φαινομένου, οι οποίες θα αποτελέσουν βάση για την διαδικασία δημιουργίας του προτεινόμενου μοντέλου.

3. ΝΟΣΟΣ ΤΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ ΚΑΙ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗ

3.1 Η Νόσος του Πάρκινσον

Η Νόσος του Πάρκινσον (ΝτΠ, Parkinson's Disease-PD) αποτελεί μία εκφυλιστική (degenerative) διαταραχή του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) που προκαλείται από την απώλεια ντοπαμινεργικών νευρώνων (κυττάρων που παράγουν και περιέχουν το νευροδιαβιβαστή Ντοπαμίνη) στη Μέλαινα Ουσία (substantia nigra), η οποία αποτελεί περιοχή του μεσεγκέφαλου (midbrain) [68, 69]. Το ποσοστό της απώλειας νευρώνων στην συγκεκριμένη περιοχή, αγγίζει το 70% [70]. Αν και γενικότερα τα αίτια του κυτταρικού θανάτου των συγκεκριμένων κυττάρων θεωρούνται άγνωστα, τις τελευταίες δεκαετίες, έχουν παρουσιαστεί σημαντικά ευρήματα πολλά εκ των οποίων περιγράφονται στις μετέπειτα ενότητες της εργασίας. Η συγκεκριμένη περιοχή του εγκεφάλου επισημαίνεται στην ακόλουθη εικόνα.

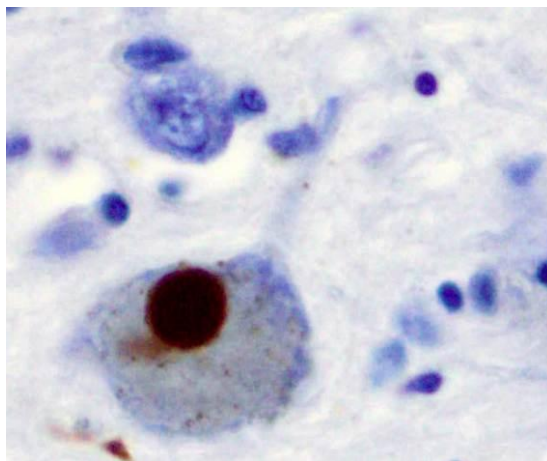


Εικόνα 3.1 Η περιοχή Μέλαινα Ουσία (substantia nigra) του εγκεφάλου

Η Ντοπαμίνη (Dopamine, DA) [71] είναι μία κατεχολαμίνη (catecholamine) που όπως προαναφέρθηκε έχει νευροδιαβιβαστικό ρόλο. Ουσιαστικά αποτελεί τον αγγελιοφόρο μεταξύ της Μέλαινας Ουσίας και των περιοχών του εγκεφάλου που ρυθμίζουν την κίνηση του ανθρωπίνου σώματος και συμβάλει στην ομαλή και συντονισμένη πραγματοποίηση αυτής [72].

Εκτός της απώλειας νευρώνων, όμως, χαρακτηριστικό της ασθένειας αποτελεί και η εμφάνιση συσσωματώσεων στους εναπομείναντες νευρώνες οι οποίες ονομάζονται σωμάτια Lewy (Lewy Bodies). Σημαντικό χαρακτηριστικό των Lewy Bodies είναι η ύπαρξη εντός αυτών ινιδίων σε ακτινωτή διάταξη τα οποία αποτελούνται από διάφορες πρωτεΐνες σε μη διαλυτή μορφή [69]. Σημαντικότερο και βασικότερο συστατικό των ινιδίων αυτών είναι η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη (ASYN), τα φαινόμενα που σχετίζονται με

την οποία αποτελούν τα βασικά αντικείμενα μελέτης της παρούσας εργασίας. Επίσης, όπως σημειώνεται στις [69, 73], τα Lewy bodies εμφανίζονται και σε άλλες περιοχές του εγκεφάλου ενώ φαίνεται να έχουν αιτιατό ρόλο στην παρατηρούμενη επιρροή της νοητικής ικανότητας των ασθενών με ΝτΠ. Στην ακόλουθη εικόνα δίνεται ένα παράδειγμα Lewy Body σε ασθενή με ΝτΠ με κατάλληλα σημειωμένη της πρωτεΐνη ASYN.



Εικόνα 3.2 Χαρακτηριστική μορφή σωματίου Lewy και η παρουσία της α -συνουκλείνης σε αυτό

Εφόσον, λοιπόν, κύριο γεγονός στην ανάπτυξη της ΝτΠ είναι η απώλεια των κυττάρων που παράγουν την Ντοπαμίνη, βασικό σύμπτωμα της ασθένειας αποτελούν οι διαταραχές της κίνησης. Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της ασθένειας, τα κυριότερα συμπτώματα αφορούν σε κινησιολογίες διαταραχές όπως τρόμος (τρέμουλο), δυσκαμψία ή ακαμψία, βραδυκίνησια ή ακίνησια και αστάθεια. Στη συνέχεια της εξέλιξης της ασθένειας μπορούν να εμφανιστούν πνευματικές (cognitive) διαταραχές και προβλήματα συμπεριφοράς ενώ η άνοια (dementia) παρουσιάζεται ιδιαίτερα συχνά στα προχωρημένα στάδια της ασθένειας. Στην ακόλουθη εικόνα παρουσιάζεται η χαρακτηριστική εικόνα ασθενούς με ΝτΠ.



Εικόνα 3.3 Χαρακτηριστική εικόνα του ασθενούς με ΝτΠ

Η εμφάνιση της ΝτΠ είναι ιδιαίτερα συχνότερη στους γηραιότερους και είναι γνωστό ότι προσβάλλει περίπου το 1% του πληθυσμού άνω των 50 ετών [74].

Αν και γενικότερα η ΝτΠ θεωρείται Σποραδική/Μη κληρονομική νόσος που επηρεάζεται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες (φυτοφάρμακα, τοξίνες και μέταλλα), αρκετά γονίδια, συμπεριλαμβανομένου και αυτού της ASYN (SNCA) έχουν συσχετιστεί με την ΝτΠ όπως τα parkin, DJ-1, PINK-1 και LRRK2, ορίζοντας έτσι και την κληρονομική μορφή της ασθένειας, η οποία ωστόσο αφορά μόνο στο 10% των περιστατικών της ΝτΠ [75].

Δυστυχώς μέχρι σήμερα δεν υπάρχει θεραπεία της ΝτΠ αλλά ούτε έχουν ανακαλυφθεί μέθοδοι που μπορούν να καθυστερήσουν την εξέλιξη της νόσου. Ωστόσο, τα συμπτώματά της μπορούν να αντιμετωπιστούν φαρμακολογικά. Δεδομένου ότι τα σημαντικότερα προβλήματα δημιουργούνται από την έλλειψη Ντοπαμίνης, η βασικότερη θεραπευτική αντιμετώπιση των συμπτωμάτων γίνεται με την υποκατάσταση της λειτουργίας της, είτε με την χορήγηση της πρόδρομης ουσίας της (L-DOPA) είτε χορηγώντας αγωνιστές της Ντοπαμίνης, δηλαδή ουσίες που μιμούνται τη δράση της. Επίσης, σε προχωρημένα περιστατικά της ΝτΠ, ακολουθούνται και χειρουργικές θεραπείες με κυριότερες την θερμοπληξία ή την τοποθέτηση κατάλληλων διεγερτών στα σημεία του κυκλώματος των Βασικών Γαγγλίων [76]

3.2 Νόσος του Πάρκινσον και α-συνουκλεΐνη

Όπως προαναφέρθηκε, η πρωτεΐνη ASYN έχει συσχετιστεί με τη ΝτΠ και λόγω της ύπαρξής της στα Lewy Bodies αλλά και γενετικά. Επίσης, τα τελευταία χρόνια υπάρχει ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα σχετικά με την ASYN φαινόμενα και την σχέση τους με την ανάπτυξη της ΝτΠ, το οποίο έχει οδηγήσει σε σημαντικά ευρήματα πολλά εκ των οποίων προέρχονται από το εργαστήριο Βασικής Νευροβιολογίας του ΙΙΒΕΑΑ. Έτσι, αποφασίστηκε η συγκεκριμένη εργασία να εντοπιστεί στα σχετικά με αυτή την πρωτεΐνη φαινόμενα, πάντοτε στα πλαίσια μίας Συστημικής προσέγγισης και η προκύπτουσα υπολογιστική μοντελοποίηση να έχει ως βασική οντότητα την συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Στις ακόλουθες ενότητες παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά της ASYN, η συσχέτιση που έχει εντοπιστεί να έχει με τη ΝτΠ αλλά και τα σημαντικά εργαστηριακά ευρήματα για την συμμετοχή της σε αυτή τα οποία και αποτέλεσαν τους στόχους μοντελοποίησης.

3.2.1 Η πρωτεΐνη α-συνουκλεΐνη

Στην παρούσα ενότητα, παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά της πρωτεΐνης α-συνουκλεΐνη αλλά και οι σημαντικότερες μέχρι σήμερα γνώσεις για την φυσιολογική λειτουργία αυτής. Η ακολουθούσα παρουσία βασίζεται στις αντίστοιχες που δίνονται στις εργασίες [77, 78].

Η α-συνουκλεΐνη είναι μέλος της οικογένειας των συνουκλεϊνών η οποία συμπεριλαμβάνει επίσης τις β-συνουκλεΐνη και γ-συνουκλεΐνη. Η ανθρώπινη α-συνουκλεΐνη αποτελείται από 140 αμινοξέα στα οποία περιέχονται υψηλά διατηρημένες αμφιπαθής/αμφίφιλες (amphipathic) N-Τερματικές (N-terminal) περιοχές με επτά επαναλήψεις του μοτίβου KTKEGV και υψηλά ετερογενής περιοχές στο C-Άκρο (C-

Terminal). Η ASYN επίσης περιέχει μία κεντρική υδροφοβική περιοχή (non-amyloid-β component domain) μέσω της οποίας μπορούν να πραγματοποιηθούν διαμοριακές (intermolecular) αλληλεπιδράσεις.

Όταν βρίσκεται απομονωμένη, η ASYN στερείται σταθερής δομής και έτσι ταξινομείται ως εγγενώς μη διπλωμένη πρωτεΐνη (natively unfolded). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί μεγάλος αριθμός μεταβατικών δομών που μπορεί να αποκτήσει οι οποίες εξαρτώνται από το περιβάλλον που βρίσκεται η πρωτεΐνη. Αυτή η δυνατότητα της ASYN θεωρείται ότι της επιτρέπει την ανάπτυξη της παθολογικής της λειτουργικότητας μέσω του σχηματισμού ολιγομερών και ινιδίων, κεντρικό ζήτημα της παρούσης εργασίας το οποίο αναλύεται με λεπτομέρεια σε επόμενες ενότητες.

Η βιολογική/φυσιολογική λειτουργία της ASYN δεν είναι πλήρως γνωστή. Ωστόσο η υψηλές συγκεντρώσεις της στις προ-συναπτικές νευρικές απολήξεις και η ικανότητα της να δεσμεύεται σε λιποειδής μεμβράνες, δίνουν ενδείξεις για συμμετοχή της στην διαδικασία της νευροδιαβίβασης. Σε μελέτες απενεργοποίησης του γονιδίου της ASYN, έχουν παρατηρηθεί σημαντικές αλλαγές στην νευροδιαβίβαση, στην ανακύκλωση των συναπτικών κυστιδίων (synaptic vesicles) αλλά και στον αριθμό αυτών. Επίσης σε παρόμοιες μελέτες έχει αναφερθεί συμμετοχή της ASYN στον μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Τέλος, από αρκετές εργασίες υποστηρίζεται ότι η ASYN έχει ρόλο σαπερόνης (chaperone) [79].

3.2.2 Συσχέτιση της α-συνουκλεΐνης με τη νόσο του Πάρκινσον

Ένας σημαντικός αριθμός εργασιών, επισημαίνουν την ύπαρξης γενετικής συσχέτισης μεταξύ των τροποποιήσεων στη φυσιολογική λειτουργία του γονιδίου της α-συνουκλεΐνης (SNCA) και της εμφάνισης των διαφόρων μορφών της ΝτΠ.

Παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις (missense mutations), δηλαδή μεταλλάξεις που οδηγούν σε κωδικοποίηση διαφορετικού αμινοξέως από ότι πριν την μετάλλαξη, στο γονίδιο της ASYN, έχουν συσχετιστεί με την κληρονομική (familial) ΝτΠ ([74], [80], [81]). Ακόμα, ο πολλαπλασιασμός του SNCA έχει επίσης συσχετιστεί με την ΝτΠ ([82], [83], [84]), ενώ πολυμορφισμοί εντός και στις γειτονικές περιοχές του SNCA που οδηγούν σε τροποποίηση της μεταγραφικής διαδικασίας του γονιδίου, αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης σποραδικής (sporadic) ΝτΠ [85]

3.2.3 Ερευνητικά ευρήματα για τα σχετικά με την α-συνουκλεΐνη φαινόμενα

Όπως αναφέρεται και στον πρόλογο, η συγκεκριμένη Διπλωματική Εργασία, πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της συνεργασίας με το τμήμα Βασικής Νευροβιολογίας του ΙΙΒΕΑΑ (στο εξής «το εργαστήριο»). Δεδομένου ότι στο συγκεκριμένο εργαστήριο ένα από τα βασικά κυτταρικά μοντέλα για την μελέτη των σχετικών με την ASYN φαινομένων αποτελούν τα κύτταρα SH-SY5Y (κυτταρική σειρά της οποίας τα χαρακτηριστικά και τα σχετικά εργαστηριακά πρωτόκολλα παρουσιάζονται στις επόμενες ενότητες και δίνονται στις εργασίες ([86], [87], [88]), εκτός της αξιοποίησης της γνώσης και των δημοσιεύσεων από το συγκεκριμένο εργαστήριο, τέθηκε ως στόχος κατά την αναζήτηση στην βιβλιογραφία των υπόλοιπων αναγκαίων πληροφοριών, αυτές να αναφέρονται σε αυτού του τύπου τα κύτταρα και σε όσο το δυνατόν παρόμοιες

εργαστηριακές διαδικασίες. Ωστόσο, κάτι τέτοιο δεν ήταν εφικτό σε όλες τις περιπτώσεις, οι οποίες επισημαίνονται στα διάφορα μέρη του κειμένου.

Επίσης, δεδομένου ότι πολλά από τα σημαντικά ευρήματα του εργαστηρίου αφορούν στην WT ASYN και ότι όπως προαναφέρθηκε οι μεταλλάξεις στο γονίδιο της ASYN δεν αποτελούν προϋπόθεση για την ανάπτυξη της ΝτΠ, επιλέχθηκε η μοντελοποίηση και κατ' επέκταση η αναζήτηση των σχετικών πληροφοριών να αφορούν στη μη μεταλλαγμένη μορφή της ASYN.

Στις ακόλουθες ενότητες παρουσιάζονται τα ερευνητικά ευρήματα στα οποία βασίστηκε ο σχεδιασμός αλλά και η εκπαίδευση του προκύπτοντος μοντέλου. Ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην συμμετοχή της Ντοπαμίνης και συγκεκριμένα στην τροποποίηση που προκαλεί στο μόριο της ASYN μιας και όπως αρκετές εργασίες υποστηρίζουν (αναφέρονται κατά περίπτωση στη σχετική ενότητα), η συγκεκριμένη τροποποίηση, επηρεάζει την διαδικασία Ολιγομερισμού και την αποδόμηση από την Διαμεσολαβούμενη από Σαπερόνες Αυτοφαγία (Chaperone Mediated Autophagy, CMA) της ASYN. Ιδιαίτερα σημαντική ένδειξη για την αναγκαιότητα μελέτης της συμμετοχής της Ντοπαμίνης στα συγκεκριμένα φαινόμενα, αποτελεί το εύρημα του εργαστηρίου ότι η καταστολή της βιολογικής διαδικασίας παραγωγής της Ντοπαμίνης οδηγεί σε ιδιαίτερα σημαντική μείωση του παρατηρούμενου κυτταρικού θανάτου [88].

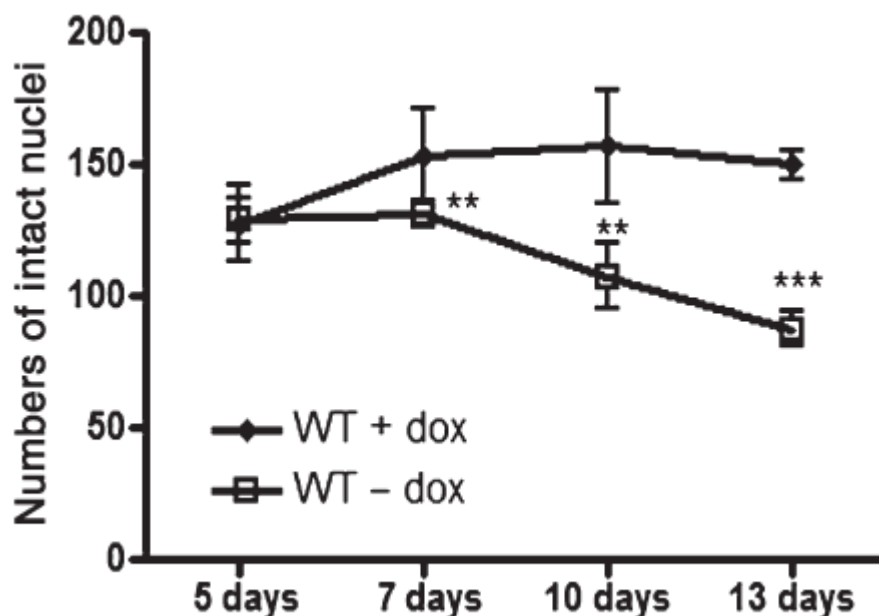
3.2.3.1 Α-συνουκλεΐνη και κυτταρικός θάνατος

Όπως προαναφέρθηκε, βασικό χαρακτηριστικό της ΝτΠ είναι απώλεια-θάνατος νευρωνικών κυττάρων. Παρά τη συσχέτιση της ASYN με τη νόσο του Πάρκινσον που δόθηκε προηγουμένως, για να θεωρηθεί η έκφραση μεταλλαγμένου γονιδίου της ASYN ή η υπερ-έκφραση της WT ASYN ως αιτία για τον κυτταρικό θάνατο, θα πρέπει τα δύο αυτά γεγονότα να συσχετιστούν. Αυτή η συσχέτιση παρουσιάζεται στην [87], όπου για τις σχετικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν SH-SY5Y ανθρώπινες κυτταρικές σειρές οι οποίες διαφοροποιούνται και λαμβάνουν νευρωνικό φαινότυπο (παρατηρείται επιμήκυνση των νευριτών και παρουσιάζεται θετική απόκριση στον ειδικό για τους νευρώνες βιοδείκτη β-III tubulin) κατόπιν εισαγωγής Ρετινοϊκού Οξέως (Retinoic Acid, RA) στην καλλιέργεια.

Η χρησιμοποιούμενη από το εργαστήριο κυτταρική σειρά έχει αναπτυχθεί έτσι ώστε η έκφραση του γονιδίου της WT ASYN να ελέγχεται από Tet-Off σύστημα [89] μέσω κατάλληλης επεξεργασίας της καλλιέργειας με Δοξυκυκλίνη (Doxycycline, dox) [90]. Κατά αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτή η ενεργοποίηση και η απενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της WT ASYN ώστε να μελετηθούν τα σχετικά με αυτή κυτταρικά φαινόμενα.

Όσον αφορά τη σχέση της α-συνουκλεΐνης με τον κυτταρικό θάνατο των νευρώνων, όπως παρουσιάζεται στην [87] όπως επίσης κατά παρόμοιο τρόπο και στην [88], η υπερ-έκφραση της ASYN σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα επηρεάζει την βιωσιμότητα αυτών, κάτι που δεν συμβαίνει σε μη διαφοροποιημένα κύτταρα (στα οποία εξελίσσεται ο κυτταρικός κύκλος) ακόμα και ύστερα από 10ήμερη υπερ-έκφραση της WT ASYN. Πιο συγκεκριμένα, για την περίπτωση των διαφοροποιημένων κυττάρων, ύστερα από 6 ημέρες καλλιέργειας με RA και υπερ-έκφρασης της WT ASYN,

εμφανίζονται μορφολογικές αλλαγές χαρακτηριστικές του κυτταρικού εκφυλισμού. Ακολούθως δίδεται γράφημα στο οποίο παρουσιάζεται η μέτρηση των ακέραιων πυρήνων (intact nuclei) για κύτταρα στα οποία υπερ-εκφράζεται η WT ASYN και για κύτταρα που η έκφραση του γονιδίου έχει κατασταλεί με την χρήση dox.



Σχήμα 3.1: Μέτρηση της βιωσιμότητας κυττάρων SH-SY5Y κατά την υπερ-έκφραση της WT ASYN [87]

Όπως είναι εύκολα αντιληπτό, κατά την υπερ-έκφραση της ASYN (WT – dox) ο αριθμός των ακέραιων πυρήνων μειώνεται αισθητά και σταδιακά μετά το πέρας των 7 ημερών διαφοροποίησης με RA. Αντιθέτως στην περίπτωση που η WT ASYN δεν υπερ-εκφράζεται, δεν παρατηρείται η συγκεκριμένη μείωση.

Επίσης ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα που παρουσιάζεται επίσης στην [87], αποτελεί το ότι ο παρατηρούμενος θάνατος αν και παρουσιάζει πολλά κοινά βιοχημικά χαρακτηριστικά με τον θάνατο μέσω απόπτωσης (apoptosis) [91], τελικά είναι μορφολογικά μη αποπτωτικός. Πιο συγκεκριμένα, παρότι παρατηρείται [87] έναρξη των αρχικών βημάτων του ενδογενούς αποπτωτικού θανάτου (intrinsic apoptosis), όπως υποδεικνύεται από την σημαντική έκλυση Κυτοχρώματος C (Cytochrome C) η οποία ρυθμίζεται από την οικογένεια αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών bcl-2, και ενεργοποίηση της Κασπάσης 9 (Caspase 9), δεν εντοπίζεται ενεργοποίηση της Κασπάσης 3 (Caspase 3) η οποία αποτελεί ουσιαστικά το ολοκληρωτικό βήμα για τον αποπτωτικό θάνατο. Επίσης, πολλά άλλα κριτήρια του συγκεκριμένου τύπου κυτταρικού θανάτου, δεν καλύπτονται (όπως το DNA laddering [92]).

Σε μετέπειτα εργασία [88], παρουσιάζονται σημαντικές ενδείξεις ότι ο παρατηρούμενος θάνατος έχει χαρακτηριστικά αυτοφαγικού θανάτου. Λεπτομέρειες για το συγκεκριμένο ζήτημα δίνονται στην Ενότητα 3.2.3.3.2.

3.2.3.2 Ο ολιγομερισμός της α-συνουκλεΐνης

Όπως αναφέρθηκε και στην Ενότητα 3.1, κατά την παρουσίαση των βασικών χαρακτηριστικών της Νόσου του Πάρκινσον, εκτός των άλλων (γενετικών) συσχετισμών της ASYN, ινίδια της ASYN έχουν εντοπιστεί στα Lewy Bodies. Ωστόσο, πριν την δημιουργία των ινιδίων αυτών, μεσολαβεί η δημιουργία βιοχημικών μορίων μικρότερου μοριακού βάρους. Πιο συγκεκριμένα η ASYN παρουσιάζει την τάση να αναδιπλώνεται εσφαλμένα (misfold) και να παρουσιάζει beta-sheet δομές [93] και κατόπιν να ξεκινάει η διαδικασία δημιουργίας ινιδίων, πρώτα ως ενδιάμεσα διαλυτά πρωτο-ινίδια (protofibrils) ή ολιγομερή (oligomers) και στη συνέχεια σε ώριμα ινίδια [78]. Η έρευνα σχετικά με τα συγκεκριμένα φαινόμενα, συγκλίνει στην άποψη ότι η σχετιζόμενη με την ASYN τοξικότητα, οφείλεται σε κάποιο γεγονός κατά την εξέλιξη της διαδικασίας σχηματισμού ινιδίων της ASYN και πιο συγκεκριμένα ότι τα ενδιάμεσα διαλυτά ολιγομερή είναι αυτά που ευθύνονται για αυτή [78]. Ενισχύοντας την συγκεκριμένη άποψη, γνωρίζουμε ότι αυτής της μορφής οντότητες της ASYN μπορούν να δημιουργήσουν αλλοιώσεις (με τον σχηματισμό πόρων) στις μεμβράνες των κυττάρων και των εσωτερικών οργανιδίων, να παρουσιάσουν παρεκκλίνουσα αλληλεπίδραση με διάφορες πρωτεΐνες του κυττάρου και να επηρεάσουν φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου [88].

Όσον αφορά, τώρα, το προαναφερθέν μελετώμενο στο εργαστήριο κυτταρικό μοντέλο SH-SY5Y, οι συγκεκριμένες οντότητες της ASYN έχουν εντοπιστεί κατά την υπερ-έκφραση της ASYN, όπως παρουσιάζεται στην [87]. Ακόμα σημαντικότερο εύρημα της συγκεκριμένης εργασίας, όμως, είναι η συσχέτιση της ύπαρξης των ολιγομερών αυτών με τον παρατηρούμενο κυτταρικό θάνατο. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το ζάχαρο Scyllo-inositol το οποίο έχει δείχθει ότι σταθεροποιεί τα ολιγομερή της πρωτεΐνης Αβ η οποία σχετίζεται με την νόσο Αλτσχάϊμερ. Εισάγοντας το συγκεκριμένο ζάχαρο στην καλλιέργεια κυττάρων που υπερέκφραζαν την WT ASYN, παρατηρούνται αυξημένα ποσοστά επιβίωσης των κυττάρων και μάλιστα σε επίπεδα αντίστοιχα της καλλιέργειας στην οποία δεν υπερ-εκφράζεται η ASYN. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παραπάνω διαδικασία δεν οδήγησε σε μείωση των επιπέδων των ολιγομερών της ASYN, κάτι που συμφωνεί με τον αντίστοιχο σταθεροποιητικό τρόπο δράσης στα ολιγομερή της Αβ.

Ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό του παραπάνω παρατηρούμενου ολιγομερισμού είναι η απουσία εύρεσης ASYN σε μορφή έγκλειστων (inclusions) ή συσσωματίων (aggregates) και απουσία β-sheet δομών, κάτι που επιβεβαιώνεται με την χρήση της χρώσης Thioflavin [94] η οποία έχει την ιδιότητα να εντοπίζει αμυλοειδή (amyloid) συσσωμάτια όπως αυτά που σχηματίζει και η ASYN. Έτσι, στα συγκεκριμένα κύτταρα και για το σύνολο της διαδικασίας των σχετικών πειραμάτων, τα οποία ολοκληρώνονται με τον θάνατο των υπό μελέτη κυττάρων, παρατηρούνται μόνο ολιγομερή της ASYN και όχι υψηλότερου μοριακού βάρους δομές.

Ολοκληρώνοντας την παρουσίαση των σχετικών με τον ολιγομερισμό της ASYN πληροφοριών, ένα ιδιαίτερα σημαντικό φαινόμενο το οποίο πολύ πιθανόν να έχει αιτιώδη σχέση στην ανάπτυξη της σχετιζόμενης με την ASYN παθολογίας, είναι αυτό της τροποποίησης της διαδικασίας του ολιγομερισμού της ASYN από την Ντοπαμίνη.

Το συγκεκριμένο φαινόμενο αποκτά σημαντική αξία δεδομένης της συσχέτισης των ολιγομερών (όπως παρουσιάστηκε παραπάνω) αλλά και της παρουσίας Ντοπαμίνης στα κύτταρα (όπως παρουσιάζεται στην [88] και στην Ενότητα 3.2.3.3.1) με τον κυτταρικό θάνατο. Πιο συγκεκριμένα, στην πρόσφατη βιβλιογραφία η δύο κυρίαρχες θεωρίες υποστηρίζουν ότι είτε η Ντοπαμίνη μπορεί να οδηγεί σε διάσπαση των ινιδίων ASYN είτε τροποποιεί καταλλήλως την ASYN ώστε αυτή να δημιουργεί ολιγομερή αλλά να μην δημιουργεί ή να δημιουργεί ιδιαίτερα καθυστερημένα, ινίδια (με την δεύτερη θεωρία να απαντάται στο μεγαλύτερο ποσοστό των σχετικών εργασιών). Μία ιδιαίτερα περιεκτική περίληψη των πρόσφατων σχετικών ευρημάτων δίδεται στην [73]. Τέλος, ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στα συμπεράσματα της εργασίας [95] στην οποία υποστηρίζεται ότι η παρουσία της Ντοπαμίνης οδηγεί σε ολιγομερισμό με διαφορετικά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα όσα παρουσιάστηκαν προηγουμένως. Μάλιστα τα ευρεθέντα ολιγομερή στη συγκεκριμένη εργασία παρουσιάζουν και αυτά αδυναμία σύνδεσης με το Thio-T κάτι που από τη μία αποτελεί ένδειξη για συμβατότητα των συμπερασμάτων με τα όσα παρατηρούνται σε SH-SY5Y κύτταρα, αλλά από την άλλη αμφισβητεί την δυνατότητα αξιοποίησης των συμπερασμάτων για τον ολιγομερισμό και τον σχηματισμό ινιδίων της ASYN που προκύπτουν από μελέτες που χρησιμοποιούν την συγκεκριμένη τεχνική εντοπισμού τους.

3.2.3.3 Α-συνουκλεΐνη και πρωτεολυτικοί μηχανισμοί

Δύο κεντρικά ζητήματα τίθενται αναφορικά με τη σχέση α-συνουκλεΐνης και των κεντρικών πρωτεολυτικών μηχανισμών του κυττάρου (Διαμεσολαβούμενη από Σαπερόνες Αυτοφαγία, Μακροαυτοφαγία και Πρωτεάσωμα):

1. Ποιοι μηχανισμοί συμμετέχουν στην αποδόμηση της ASYN (είτε της μονομερούς μορφής, είτε των ολιγομερών αυτής) και με τι ποσοστό συμμετέχουν στην συνολική αποδόμηση αυτής.
2. Ποιους από αυτούς τους μηχανισμούς επηρεάζει η υπερ-έκφραση της ASYN αλλά και η τροποποίηση αυτής από την DA.

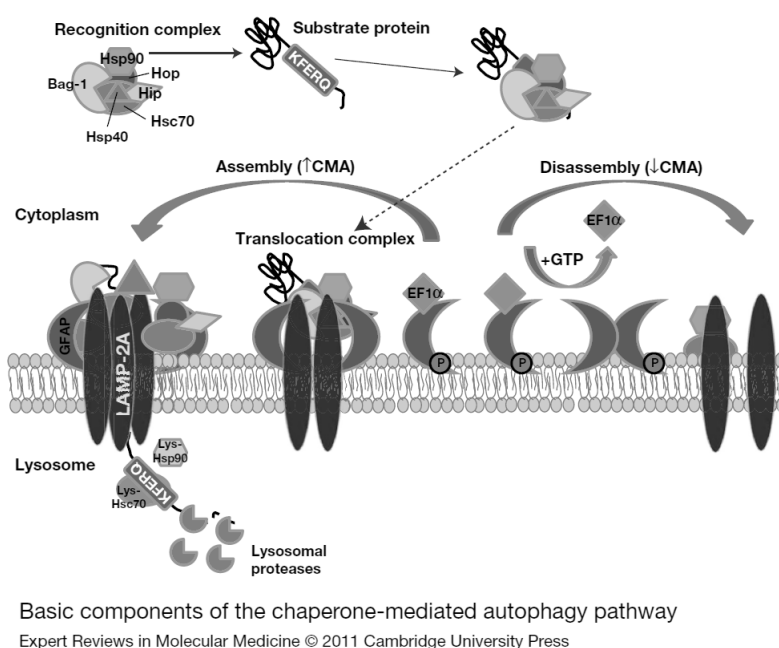
Στις ακόλουθες ενότητες παρουσιάζονται τα σημαντικότερα ευρήματα σχετικά με τα συγκεκριμένα ζητήματα.

3.2.3.3.1 Α-συνουκλεΐνη, Διαμεσολαβούμενη από Σαπερόνες Αυτοφαγία και Λυσοσώματα

Όσον αφορά την συμμετοχή Διαμεσολαβούμενης από Σαπερόνες Αυτοφαγίας (CMA) στην αποδόμηση της α-συνουκλεΐνης, στην [86] έχειδειχθεί ότι το CMA έχει διακριτό και ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην αποδόμησή της. Το συγκεκριμένο συμπέρασμα εξήχθη και για SH-SY5Y κυτταρική σειρά, όπως επίσης και για PC12 κυτταρική σειρά αλλά και πρωτογενείς νευρώνες (primary neurons).

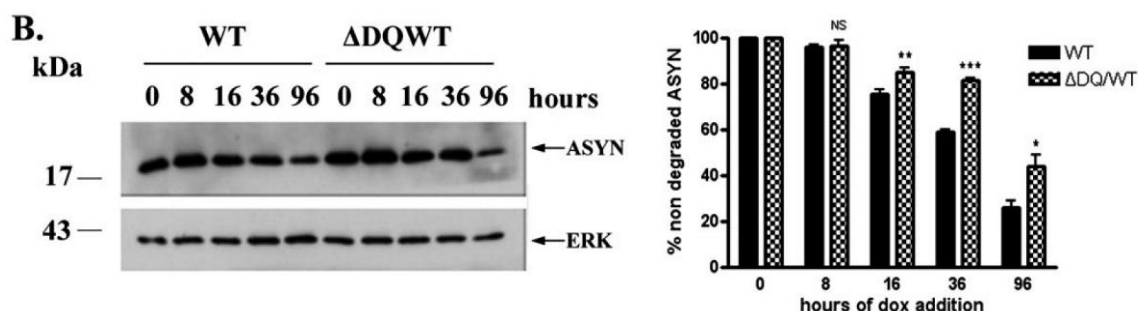
Η αποδόμηση μέσω του CMA βιολογικού μονοπατιού, αποτελεί έναν από του σημαντικότερους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς του κυττάρου. Όπως περιγράφεται στην [96], το CMA είναι επιλεκτικός μηχανισμός αποδόμησης πρωτεϊνών, που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα, μέσω των λυσοσωμάτων. Ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν απαιτεί τον σχηματισμό κυστιδίων (vesicles) όπως π.χ. η Μακροαυτοφαγία που

παρουσιάζεται σε επόμενη ενότητα, αλλά μία προς μία οι πρωτεΐνες εισέρχονται στα λυσοσώματα. Οι πρωτεΐνες αυτές πρέπει να φέρουν ένα μοτίβο πέντε πεπτιδίων τα οποία είναι τα KFERQ ή μία βιοχημικά σχετική ακολουθία και τότε αναγνωρίζονται από σαπερόνες (chaperones) στο κυτταρόπλασμα ώστε να μεταφερθούν στα λυσοσώματα, να δεθούν στο υποδοχέα (receptor) Lamp2a και κατόπιν να εσωτερικευτούν. Το συγκεκριμένο μοτίβο παρουσιάζεται στο 30% των κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών ενώ και άλλες πρωτεΐνες μπορούν να καταλήξουν στόχοι του CMA, έπειτα από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (post-translational modifications). Η συνολική διαδικασία δίνεται στην παρακάτω εικόνα και ο ενδιαφερόμενος αναγνώστης παραπέμπεται στην [96] και στις αναφορές που δίνονται σε αυτή.



Εικόνα 3.4: Βασικά βήματα της Διαμεσολοβούμενης από Σαπερόνες Αυτοφαγίας [96]

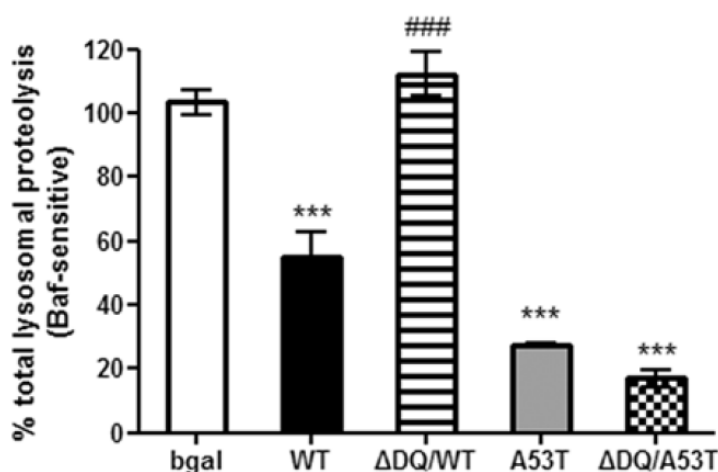
Δύο τρόποι ακολουθήθηκαν στην [86] για την απόδειξη ότι η ASYN αποδομείται από το CMA. Πρώτον η καταστολή του υποδοχέα Lamp2a μέσω παρεμβατικού RNA (RNA interference, RNAi) [97] και δεύτερον η αντικατάσταση της WT μορφής της ASYN με την ΔΔQ/WT μορφή στην οποία απουσιάζει το μοτίβο KFERQ. Στο ακόλουθο σχήμα συνοψίζονται τα αποτελέσματα του πειράματος στο οποίο SH-SY5Y κύτταρα που εξέφραζαν είτε την WT ASYN είτε την ΔΔQ/WT ASYN για 5 ημέρες, σταμάτησαν να την εκφράζουν με την προσθήκη dox και μετρήθηκαν τα επίπεδα της μη αποδομημένης ASYN κατά της επόμενες ώρες.



Σχήμα 3.2: Ποσοστιαία σύγκριση της αποδόμησης της ΔΔQ/WT ASYN σε σχέση με την WT ASYN [86]

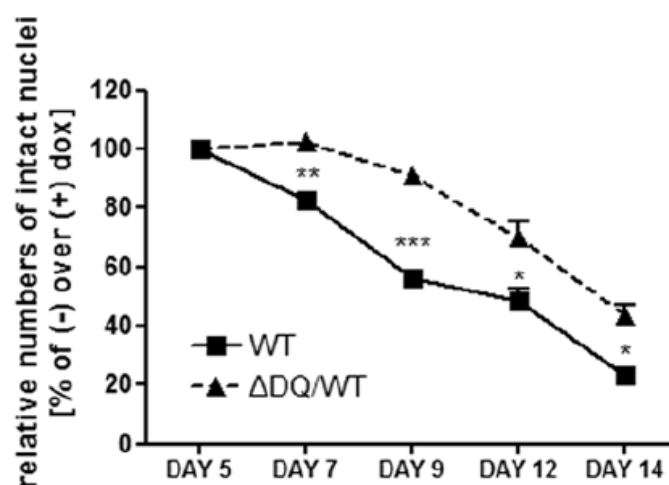
Όπως είναι εμφανές, στην περίπτωση που η ASYN δεν μπορεί να αποδομηθεί από το CMA, τα επίπεδά της παραμένουν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με τις φυσιολογικές συνθήκες, υποδεικνύοντας ότι ο ρόλος του CMA στην αποδόμηση της ASYN υφίσταται και είναι σημαντικός.

Στην περίπτωση τώρα που υπερ-εκφράζεται η ASYN, όπως επισημαίνεται στην [88], παρουσιάζεται διατάραξη της λυσοσωμικής πρωτεολυτικής ομοιόστασης των κυττάρων. Ακολουθώντας παρόμοια εργαστηριακή διαδικασία με προηγουμένως, στο ακόλουθο σχήμα παρουσιάζεται η επιρροή της υπερ-εκφρασμένης ASYN (είτε της WT είτε της μετάλλαξης A53T) στην συνολική λυσοσωμική πρωτεόλυση.



Σχήμα 3.3: Σύγκρισης της επιρροής στην συνολική λυσοσωμική πρωτεόλυση των διαφόρων μεταλλάξεων της ASYN [88]

Από τα ανωτέρω αποτελέσματα είναι εμφανές ότι η συγκεκριμένη διατάραξη της πρωτεολυτικής λειτουργίας, οφείλεται στην στόχευση της WT ASYN από το CMA, αφού στην περίπτωση της ΔDQ/WT δεν εμφανίζεται. Εξόχως σημαντικό συμπέρασμα όμως, προκύπτει από την μέτρηση των ακέραιων πυρήνων, όπως στην περίπτωση στο Σχήμα 3.1 και τα αποτελέσματά της εμφανίζονται στο παρακάτω σχήμα.

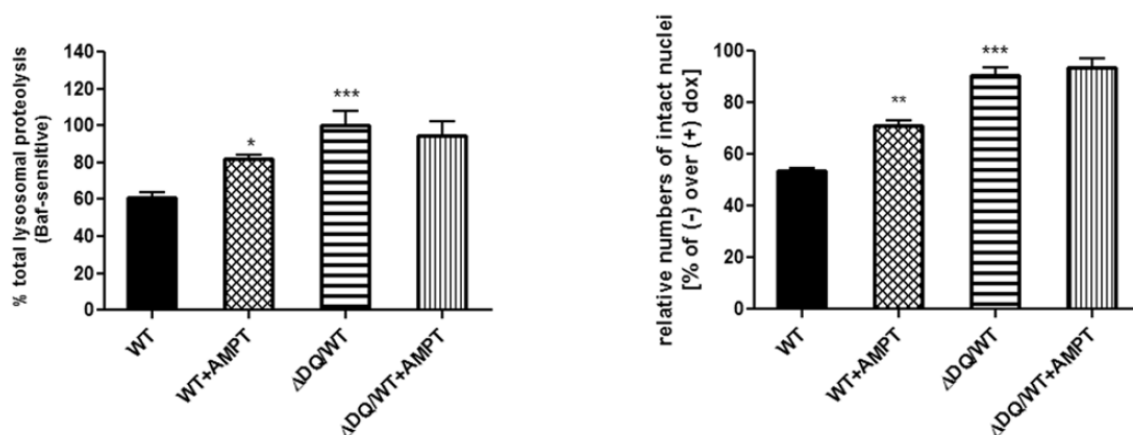


Σχήμα 3.4: Σύγκριση της βιωσιμότητας των κυττάρων SH-SY5Y κατά την υπερ-έκφραση της WT και της ΔDQ/WT ASYN [88]

Όπως είναι εύκολα αντιληπτό, στην περίπτωση όπου εκφράζεται η ΔDQ/WT ο παρατηρούμενος κυτταρικός θάνατος είναι σαφώς πιο περιορισμένος και ακολουθεί μία προοδευτική και σταθερή πορεία. Αντιθέτως, η (υπερ-)έκφραση της WT ASYN αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα κυτταρικού θανάτου, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η διατάραξη της λυσοσωμικής πρωτεολυτικής διαδικασίας είναι σημαντική αιτία του κυτταρικού θανάτου.

Αναζητώντας τους λόγους για τους οποίους συμβαίνει η συγκεκριμένη διατάραξη και δεδομένου του ντοπαμινεργικού φαινότυπου των SH-SY5Y, οι έρευνες του εργαστηρίου εντοπίστηκαν στην συμβολή που μπορεί να έχει η Ντοπαμίνη. Από την βιβλιογραφία [98] είναι γνωστό ότι η μη τροποποιημένη ASYN δεσμεύεται και εσωτερικεύεται στα λυσοσώματα χωρίς να καταπιέζει την αποδόμηση των υπολοίπων στόχων του CMA ενώ τα ολιγομερή αυτής παρότι δεν εσωτερικεύονται και έτσι δεν μπορούν να αποδομηθούν, δεσμεύονται στον Lamp2a, χωρίς ωστόσο και αυτά να δημιουργούν προβλήματα στην πρωτεολυτική διαδικασία. Ωστόσο, όταν η ASYN έχει τροποποιηθεί από την Ντοπαμίνη, τότε προσδένεται με ακόμα μεγαλύτερη τάση στον Lamp2a ενώ ταυτόχρονα δεν εσωτερικεύεται και επηρεάζει σημαντικά την αποδόμηση των υπολοίπων πρωτεϊνών μιας και παραμένει προσδεμένη στον υποδοχέα, μην επιτρέποντας την φυσιολογική λειτουργία του.

Για την εξακρίβωση του αιτιώδους της σχέσης Ντοπαμίνης και ASYN στο κυτταρικό μοντέλο του εργαστηρίου, χρησιμοποιήθηκε η α-methyl-p-tyrosine (AMPT) η οποία καταστέλλει την Τυροσίνη Υδροξυλάση (Tyrosine Hydroxylase, TH) η οποία εμπλέκεται κεντρικά στην παραγωγή της Ντοπαμίνης. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης καταστολής εμφανίζονται στο ακόλουθο σχήμα.



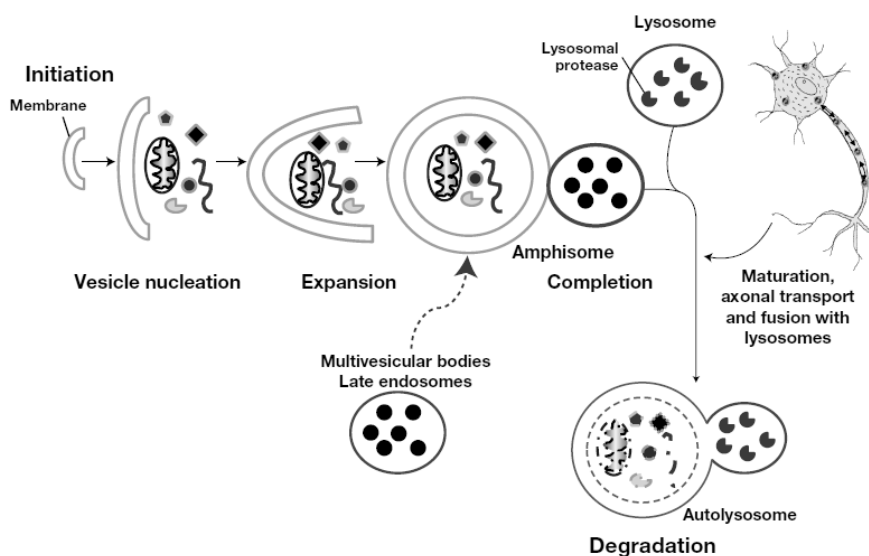
Σχήμα 3.5: Μέτρηση της επιρροής της Ντοπαμίνης στην πρωτεολυτική δυσλειτουργία και στην μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων [88]

Όπως είναι εμφανές, η απενεργοποίηση της παραγωγής της Ντοπαμίνης (περιπτώσεις που συμβολίζονται με +AMPT), οδηγεί και σε μειωμένη διατάραξη της λυσοσωμικής πρωτεολυτικής διαδικασίας (αριστερό γράφημα) αλλά και σε μειωμένο κυτταρικό θάνατο (δεξί γράφημα). Έτσι, συμπερασματικά, η Ντοπαμίνη εμφανίζεται να έχει κεντρικό ρόλο στα σχετικά με την α-συνουκλείνη φαινόμενα και για αυτό το λόγο επιλέχθηκε η συμπερίληψή της στο μοντέλο, όπως θα παρουσιαστεί και σε επόμενες ενότητες.

3.2.3.3.2 Α-συνουκλεΐνη και Μακροαυτοφαγία

Όπως παρουσιάζεται σε σημαντικό αριθμό της πρόσφατης βιβλιογραφίας, η σχέση της ASYN και της Μακροαυτοφαγίας (Macroautophagy) είναι ιδιαίτερα σημαντική όχι μόνο όσον αφορά την αποδόμηση της ASYN αλλά για τον παρατηρούμενο κυτταρικό θάνατο σε συνθήκες υπερ-έκφρασης της συγκεκριμένης πρωτεΐνης.

Η μακροαυτοφαγία αποτελεί πρωτεολυτικό βιολογικό μονοπάτι και αποτελεί ένα από τα αυτοφαγικά μονοπάτια του κυττάρου (όπως και το CMA) [96]. Κύριος ρόλος της μακροαυτοφαγίας είναι η αποδόμηση των δυσλειτουργικών/κατεστραμμένων οργανιδίων του κυττάρου αλλά και πρωτεϊνών με υψηλό χρόνο ζωής (long-lived proteins) [99]. Στην ακόλουθη εικόνα, παρουσιάζονται τα βασικά βήματα της εξέλιξης του συγκεκριμένου μονοπατιού.



Schematic representation of the macroautophagic pathway in mammalian cells
Expert Reviews in Molecular Medicine © 2011 Cambridge University Press

Εικόνα 3.5 Τα κεντρικά βήματα της Μακροαυτοφαγίας [96]

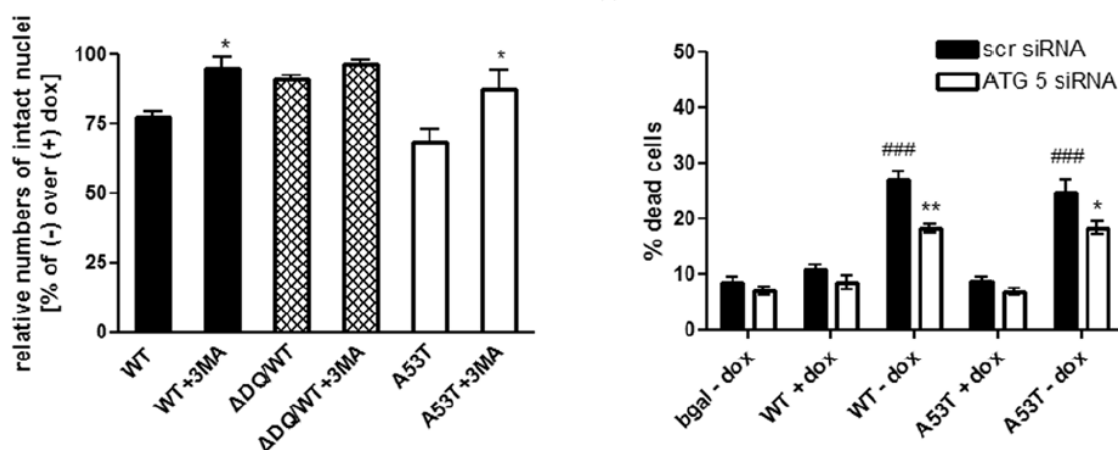
Στα αρχικά στάδια, τμήματα διπλής μεμβράνης ελλειπτικού σχήματος, προερχόμενα από διάφορα μέρη του κυττάρου, που ονομάζονται φαγοφόρα (phagophores), δημιουργούνται εντός του κυττάρου. Αυτά τα τμήματα, σταδιακά δημιουργούν το Αυτοφαγόσωμα (Autophagosome), μία κύστη που περιβάλλεται από διπλή μεμβράνη και περιέχει εντός τού υλικό του κυτταροπλάσματος, όπως οργανίδια και πρωτεΐνες. Στα επόμενα βήματα, το αυτοφαγώσωμα συγχωνεύεται με το λυσόσωμα, δημιουργώντας μία νέα δομή αυτή του αυτοφαγολυσωσώματος όπου εντός αυτής αποδομούνται οι διάφορες οντότητες. Ιδιαίτερα σημαντικό χαρακτηριστικό της μακροαυτοφαγίας αποτελεί το ότι το αυτοφαγόσωμα μπορεί να δημιουργηθεί ακόμα και σε περιοχές του κυττάρου που βρίσκονται μακριά από το λυσόσωμα.

Σχετικά με την συμμετοχή της μακροαυτοφαγίας στην αποδόμηση της ASYN, τώρα, παρότι το ζήτημα παραμένει ακόμα ανοικτό, στην [86] έχει αποδειχθεί επιτυχώς ότι ο συγκεκριμένος πρωτεολυτικός μηχανισμός συνεισφέρει στην αποδόμηση της ASYN (τουλάχιστον της μονομερούς μορφής της). Για την εξακρίβωση της συμμετοχής της

μακροαυτοφαγίας, αυτή καταστέλλεται μέσω της προσθήκης του ειδικού για την μακροαυτοφαγία καταστολέα 3-MA, και συγκρίνεται ο ρυθμός αποδόμησης της ASYN με ή χωρίς την συγκεκριμένη καταστολή. Επίσης, σε πρόσφατα πειράματα του εργαστηρίου (τα οποία δεν είχαν δημοσιευτεί κατά την περίοδο συγγραφής της παρούσας εργασίας) έχει μελετηθεί η επιρροή της μακροαυτοφαγίας στα επίπεδα των ολιγομερών της ASYN. Τα προκύπτοντα ποιοτικά προς το παρόν συμπεράσματα ήταν ότι υπάρχει σημαντική συμμετοχή της μακροαυτοφαγίας στην αποδόμηση των οντοτήτων της ASYN από το μονομέρες μέχρι το 8-μερές ενώ για το 9-μερές, δεδομένου ότι στα συγκεκριμένα πειράματα η σχετική και διακριτή για τη συγκεκριμένη περίπτωση μπάντα στα 130kDa (λεπτομέρειες για τη μέθοδο μέτρησης και απόκτησης δεδομένων δίνονται στην ενότητα που περιγράφονται οι πηγές δεδομένων) εμφανιζόταν ανεπηρέαστη, αποφασίστηκε να θεωρηθεί ότι ο συγκεκριμένος μηχανισμός δεν συμμετέχει στην αποδόμηση της συγκεκριμένης οντότητας.

Πέραν όμως από την αποδόμηση της ASYN, όπως προαναφέρθηκε, υπάρχει σημαντική συσχέτιση μεταξύ της υπερ-έκφρασης της ASYN και της μακροαυτοφαγίας όσον αφορά τον παρατηρούμενο κυτταρικό θάνατο. Πιο συγκεκριμένα, δεδομένου ότι ο θάνατος που παρατηρείται είναι μη αποπτωτικός, θα πρέπει να συμβαίνει με κάποια από τις εναλλακτικές μορφές κυτταρικού θανάτου, μία εκ των οποίων είναι και ο αυτοφαγικός θάνατος (autophagic cell death) [100]. Ο λόγος που οδήγησε στην μελέτη του συγκεκριμένου τρόπου κυτταρικού θανάτου στην [88] είναι ότι κατά την καταπίεση της λυσοσωμικής πρωτεολυτικής διαδικασίας που παρατηρείται όταν υπερ-εκφράζεται η ASYN παρατηρείται επίσης σημαντική αύξηση της διαδικασίας μετατροπής της LC3-I σε LC3-II, μετατροπή η οποία αποτελεί δείκτη της έναρξης της επαγωγής της μακροαυτοφαγίας. Θα πρέπει να σημειωθεί μάλιστα ότι το συγκεκριμένο φαινόμενο, δεν εμφανίζεται κατά την έκφραση της ΔDQ/WT ASYN και έτσι εξάγεται το συμπέρασμα ότι η καταστολή του CMA ευθύνεται για την μείωση της λυσοσωμικής λειτουργίας αλλά και την κινητοποίηση της μακροαυτοφαγίας. Ωστόσο η συγκεκριμένη κινητοποίηση, δεν συνοδεύεται και από την αναμενόμενη αύξηση της αποδόμησης κυτταρικών οντοτήτων από την μακροαυτοφαγία (μη παραγωγική μακροαυτοφαγία/non-productive macroautophagy).

Εφόσον, λοιπόν, η επαγωγή της μακροαυτοφαγίας δεν αφορά στην υποβοήθηση της πρωτεολυτικής διαδικασίας, μελετήθηκε η σχέση που μπορεί να υπάρχει μεταξύ αυτής της επαγωγής και του κυτταρικού θανάτου. Χρησιμοποιώντας είτε τον φαρμακολογικό καταστολέα 3-MA είτε ένα κατάλληλο RNAi κατά του γονιδίου ATG 5, κατεστάλη η μακροαυτοφαγία σε SH-SY5Y κύτταρα που υπερ-έκφραζαν την WT ASYN και μετρήθηκε ο αντίστοιχος παρατηρούμενος κυτταρικός θάνατος. Τα αποτελέσματα των συγκεκριμένων πειραμάτων παρουσιάζονται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 3.6: Η συμμετοχή της Μακροαυτοφαγίας στον κυτταρικό θάνατο κατά την υπερ-έκφραση της WT ASYN [88]

Όπως είναι εμφανές, στις περιπτώσεις όπου η μακροαυτοφαγία έχει κατασταλεί (αριστερά: στήλη WT+3MA σε σχέση με την στήλη WT, δεξιά: στήλες WT-dox), ο παρατηρούμενος κυτταρικός θάνατος (είτε αυτός μεταφράζεται σε μείωση των ακεραίων πυρήνων-αριστερά, είτε σε αριθμό νεκρών κυττάρων-δεξιά) είναι μειωμένος και έτσι μπορεί να υποστηριχθεί ότι η καταστολή της μακροαυτοφαγίας δρα προστατευτικά για το κύτταρο, παρά την επακόλουθη αύξηση των επιπέδων της ASYN [88]. Τα συγκεκριμένα δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η υπερ-έκφραση της WT-ASYN οδηγεί πιθανότατα σε αυτοφαγικό θάνατο, ο οποίος ωστόσο, όπως αναφέρεται και στην [100], παρουσιάζει πολλά σημεία διασύνδεσης με την απόπτωση και έτσι χρήζει προσεκτικής μελέτης και συστημικής προσέγγισης όπως θα περιγραφεί και στους μελλοντικούς στόχους της εργασίας (δεδομένου ότι στην παρούσα φάση ανάπτυξης του μοντέλου που θα παρουσιαστεί στις επόμενες ενότητες, δεν μοντελοποιείται το φαινόμενο του κυτταρικού θανάτου).

Καταλήγοντας, θα πρέπει να τονιστεί ξανά ότι, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η καταπίεση του CMA οδηγεί στην κινητοποίηση της μακροαυτοφαγίας η οποία παρουσιάζεται να ευθύνεται για τον παρατηρούμενο θάνατο, συμπέρασμα το οποίο θα φανεί ιδιαίτερα χρήσιμο κατά την ανάγνωση των αποτελεσμάτων της μοντελοποίησης του υπό μελέτη συστήματος.

3.2.3.3.3 Α-συνουκλεΐνη και Πρωτεάσωμα

Παρότι η σχέση α-συνουκλεΐνης έχει να παρουσιάσει πολλά αναπάντητα ερωτήματα ακόμα, η βιβλιογραφία την τελευταία δεκαετία έχει να αναδείξει σημαντικά ευρήματα, τα κυριότερα εκ των οποίων παρουσιάζονται στην παρούσα ενότητα. Η παρουσίαση που ακολουθεί βασίζεται στην αντίστοιχη που δίνεται στην [101] και ο αναγνώστης παραπέμπεται σε αυτή για περαιτέρω λεπτομέρειες και αναφορές (πέραν των όσων δίνονται).

Το σύστημα Ουμπικουιτίνης-Πρωτεασώματος (Ubiquitin-Proteasome System/UPS) είναι ένα κεντρικό σύστημα για την αποδόμηση των πρωτεϊνών εντός του κυττάρου. Ταυτόχρονα αποτελεί έναν ιδιαίτερα σύνθετο μηχανισμό ο οποίος εμφανίζει δύο διακριτά και ακολουθιακά βήματα στη λειτουργικότητά του. Το πρώτο βήμα αφορά στην

ουμπικιτινυλίωση (ubiquitylation), μία διαδικασία μέσω της οποίας μία μικρή πρωτεΐνη η ουμπικουΐνη (ubiquitin) [102], προσδένεται στις πρωτεΐνες που θα πρέπει να αποδομηθούν ώστε αυτές να σημανθούν. Σε ακόλουθα βήματα δημιουργείται μία αλυσίδα ουμπικουΐνης. Στο δεύτερο βήμα της αποδομητικής διαδικασίας, η αλυσίδα αυτή αναγνωρίζεται από τον κεντρικό πρωτεολυτικό μηχανισμό του UPS, το 26s σύμπλοκο πρωτεασώματος [103], το οποίο αποδομεί την σημασμένη πρωτεΐνη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το UPS θεωρείται πως έχει κεντρικό ρόλο στην αποδόμηση των μεταλλαγμένων ή των προβληματικώς σχηματισμένων πρωτεϊνών, προλαμβάνοντας έτσι τη δημιουργία συσσωματίων (aggregates) και εγκλείστων (inclusions). Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι υπάρχει μία ιδιαίτερη συσχέτιση μεταξύ συσσωματίων και UPS, με τα εργαστηριακά ευρήματα να υποστηρίζουν ότι τα συσσωμάτια μπορούν να καταστείλουν την λειτουργικότητα του [101].

Όσον αφορά τη σχέση μεταξύ ASYN και UPS, αυτή είναι ένας χώρος ο οποίος ακόμα μελετάται και πολλά ερωτήματα μένουν να απαντηθούν. Για παράδειγμα υπάρχει σημαντική διχογνωμία για το κατά πόσο το πρωτεάσωμα συμμετέχει στην διαδικασία αποδόμησης της ASYN, με μεγάλο αριθμό εργασιών να μην εντοπίζουν σημαντικές αυξήσεις στα επίπεδα της συνολικής ASYN έπειτα από φαρμακολογική καταπίεση του μηχανισμού αυτού (συμπεριλαμβανομένης της [86]) ενώ σε άλλες εργασίες συμπεραίνεται ακριβώς το αντίθετο. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικά ευρήματα για την καταπίεση του συγκεκριμένου μηχανισμού κατά την υπερ-έκφραση της ASYN και πιο συγκεκριμένα, εμφανίζεται να υπάρχει σχέση μεταξύ των ολιγομερών της ASYN και του πρωτεασώματος. Ειδικότερα, παρότι τα συσσωμάτια και τα εγκλείστα θεωρούνται πως έχουν τον κυρίαρχο ρόλο στην καταπίεση του UPS, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η ASYN σε κατάσταση ολιγομερούς μπορεί να κάνει το ίδιο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ευρήματα της [104], τα οποία αφορούν σε σχετικές μελέτες που έγιναν στο εργαστήριο του Τμήματος Βασικής Νευροβιολογίας του ΙΙΒΕΑΑ και στα οποία χρησιμοποιήθηκε και το κυτταρικό μοντέλο SH-SY5Y. Η εργασία καταλήγει ότι ολιγομερή της ASYN ταυτόχρονα αποδομούνται από, αλλά και καταπιέζουν, το πρωτεάσωμα κάτι που επιβεβαιώνεται από την απουσία αυτής της καταπίεσης όταν χρησιμοποιούνται φαρμακολογικοί παράγοντες που διασπούν τα ολιγομερή. Ο τρόπος που συμβαίνει αυτή η καταπίεση ακόμα δεν είναι γνωστός αλλά υπάρχουν αρκετές ενδείξεις για αυτόν όπως περιγράφονται στην [101]. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα συγκεκριμένα ευρήματα αποτέλεσαν τη βάση για την μοντελοποίηση των σχετικών με την ASYN και το πρωτεάσωμα φαινομένων όπως περιγράφεται στο Κεφάλαιο 4.

3.2.3.4 Επιπλέον μηχανισμοί και φαινόμενα που επηρεάζονται από την α-συνουκλεΐνη

Εκτός των φαινομένων που περιγράφηκαν στις προηγούμενες ενότητες, η βιβλιογραφία έχει να επιδείξει έναν ιδιαίτερα σημαντικό αριθμό επιπλέον φαινομένων τα οποία σχετίζονται με την ASYN. Παρότι τα συγκεκριμένα φαινόμενα δεν τέθηκαν ως στόχοι μοντελοποίησης για την παρούσα φάση ανάπτυξης του μοντέλου, μαζί με τις πιθανές μορφές κυτταρικού θανάτου που εμφανίζεται κατά την υπερ-έκφραση της ASYN, τίθενται ως στόχοι για την περαιτέρω επέκταση του μοντέλου, όπως αναφέρεται και στους μελλοντικούς στόχους που περιγράφονται στο Συμπερασματικό Κεφάλαιο.

Σημαντικά ευρήματα, έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία όσον αφορά τη σχέση της ASYN και του ασβεστίου. Συγκεκριμένα έχει δειχθεί [105] ότι διάφορες μορφές ολιγομερών της ASYN μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένη εισροή ασβεστίου σε κύτταρα SH-SY5Y κάτι που μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ομοιόσταση αυτών. Επίσης στο εργαστήριο του Τμήματος Βασικής Νευροβιολογίας του ΙΙΒΕΑΑ έχει παρατηρηθεί ότι τα κύτταρα που υπερ-εκφράζουν την ASYN παρουσιάζουν αυξημένη τάση εισδοχής ασβεστίου (μη δημοσιευμένα πειράματα την περίοδο συγγραφής της παρούσας εργασίας).

Ακολούθως, σημαντικές ενδείξεις υπάρχουν για το ότι η ASYN και τα ολιγομερή της δημιουργούν προβλήματα στα μιτοχόνδρια. Το συγκεκριμένο ζήτημα μελετήθηκε και σε κύτταρα SH-SY5Y, στην εργασία αναφοράς [87], στην οποία αναφέρεται η παρατήρηση σημαντικής αλλαγής στην διαμεμβρανική τάση (transmembrane potential) [106] της μεμβράνης των μιτοχονδρίων. Επίσης η έκλυση κυτοχρώματος-C που παρατηρείται στην ίδια εργασία, παρά το ότι δεν ολοκληρώνεται η διαδικασία της απόπτωσης, σημαίνει ότι υπάρχουν σημαντικές μεταλλαγές στα μιτοχόνδρια λόγω της υπερ-έκφρασης της ASYN.

Τέλος, ένα ιδιαίτερα σημαντικό εύρημα το οποίο οδηγεί τις μελέτες σχετικά με την ASYN σε νέα προοπτική, είναι η εύρεση μηχανισμού μέσω του οποίου εκκρίνονται οντότητες ASYN έξω από το κύτταρο. Μάλιστα έχει δειχθεί ότι ο συγκεκριμένος μηχανισμός έχει ως ρυθμιστικό παράγοντα το ασβέστιο, κάτι ιδιαίτερα σημαντικό δεδομένων και των υπολοίπων ευρημάτων για τη σχέση ASYN και ασβεστίου. Το συγκεκριμένο φαινόμενο επιβεβαιώνεται και με την εύρεση ASYN στο CSF (Cerebrospinal fluid - Εγκεφαλονωτιαίο υγρό) και στο πλάσμα ανθρώπων. Ακόμα σημαντικότερο εύρημα, όμως, αποτελεί το ότι είτε χαμηλού είτε υψηλού μοριακού βάρους μοριακές οντότητες της ASYN που έχουν εκκριθεί, εμφανίζουν τοξικότητα για άλλα κύτταρα, η οποία τοξικότητα αναστέλλεται με την χρήση κατάλληλων ενώσεων που αλληλεπιδρούν με τα ολιγομερή της ASYN. Έτσι, διαμορφώνεται η υπόθεση ότι η έκκριση της ASYN δρα ενισχυτικά στην ανάπτυξη της ΝτΠ δίνοντας της χαρακτηριστικά διάδοσης μεταξύ των νευρώνων. Τα ζητήματα σχετικά με το συγκεκριμένο φαινόμενο παρουσιάζονται στις εργασίες [107, 108].

4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΥΣΤΗΜΙΚΗΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗΣ ΣΤΙΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΩΝ ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΗΝ Α-ΣΥΝΟΥΚΛΕΪΝΗ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΣΤΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΠΑΡΚΙΝΣΟΝ

4.1 Υπολογιστική μοντελοποίηση της επιρροής της υπερ-έκφρασης και του ολιγομερισμού της α-συνουκλεΐνης στην νευρωνική ομοιότητα

Δεδομένων των ευρημάτων που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο Κεφάλαιο, η πλειονότητα των οποίων αφορά σε μελέτες που έγιναν στο εργαστήριο του τμήματος Βασικής Νευροβιολογίας του ΙΙΒΕΑΑ, αλλά και των ανοιχτών ερωτημάτων που περιγράφηκαν, θεωρήθηκε σημαντική η έναρξη της συνεργασίας μεταξύ Νευροβιολόγων και επιστημόνων Πληροφορικής ώστε να αναπτυχθεί ένα μοντέλο Συστημικής Βιολογίας που θα αφορά στα σχετικά με την α-συνουκλεΐνη φαινόμενα. Κεντρικός στόχος της ανάπτυξης του μοντέλου είναι η υποστήριξη των εργαστηριακών μελετών μέσω της υπολογιστικής προσομοίωσης των εργαστηριακών συνθηκών αλλά και μέσω του ελέγχου υποθέσεων για διάφορες παρεμβάσεις-τροποποιήσεις στο σύστημα. Βασικό βήμα, ωστόσο, σε αυτή την πορεία, αποτελεί η ανάπτυξη του κεντρικού κορμού του μοντέλου, δηλαδή του τμήματος εκείνου που είναι ικανό να προσομοιώσει τα επίπεδα της α-συνουκλεΐνης και τις βασικές αλληλεπιδράσεις της με τους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς. Το συγκεκριμένο μοντέλο μπορεί στη συνέχεια να αποτελέσει βάση για τον έλεγχο υποθέσεων σχετικά με φαινόμενα για τα οποία υπάρχουν ακόμα σημαντικά ανοιχτά ερωτήματα και έτσι να συνεπικουρήσει στην βιολογική έρευνα. Θα πρέπει να σημειωθεί, ωστόσο, ότι όπως θα φανεί και στα αποτελέσματα, ακόμα και το βασικό μοντέλο είναι ικανό να κάνει προβλέψεις, πέραν των συνθηκών για τις οποίες έχει εκπαιδευτεί. Στις ακόλουθες ενότητες, παρουσιάζονται λεπτομερώς οι στόχοι και εν συνεχεία τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την δημιουργία του μοντέλου.

4.1.1 Στόχοι

Ως κύριος στόχος της πρώτης και παρούσας φάσης της ανωτέρω αναφερόμενης συνεργασίας καθορίστηκε η δημιουργία ενός υπολογιστικού μοντέλου που θα:

- ενσωματώνει την διαθέσιμη βιβλιογραφική και εργαστηριακή γνώση όσον αφορά τη δομή του βιολογικού συστήματος (τοπολογία βιοχημικού δικτύου)
- εκπαιδευτεί με τα διαθέσιμα στο εργαστήριο δεδομένα για την περίπτωση της υπερ-έκφρασης της ASYN
- προσομοιώνει τη δυναμική (dynamics) του υπό μοντελοποίηση συστήματος κατά την υπερ-έκφραση της WT ASYN, τον επακόλουθο ολιγομερισμό αυτής και τις βασικές λειτουργικότητες των λυσοσωμικών, μακροαυτοφαγικών και πρωτεασωμικών βιολογικών μονοπατιών που εμπλέκονται στην παρεκκλίνουσα λειτουργία της ASYN καθώς και την συμμετοχή της Ντοπαμίνης σε αυτή.
- να δώσει κάποιες προβλέψεις για τα μέχρι σήμερα άγνωστα επίπεδα της εσωκυττάριας ASYN που είναι ικανά να οδηγήσουν στις προαναφερθείσες ομοιοστατικές δυσλειτουργίες

- να διερευνηθεί αν συμφωνεί με διάφορα εργαστηριακά ευρήματα που αφορούν σε παρεμβάσεις στους διάφορους μηχανισμούς του κυτταρικού συστήματος για τα οποία δεν έχει εκπαιδευτεί με σχετικά δεδομένα, στα πλαίσια της απόδειξης της ορθότητας του μοντέλου, ως χρήσιμου εργαλείου για τον *in silico* έλεγχο υποθέσεων.

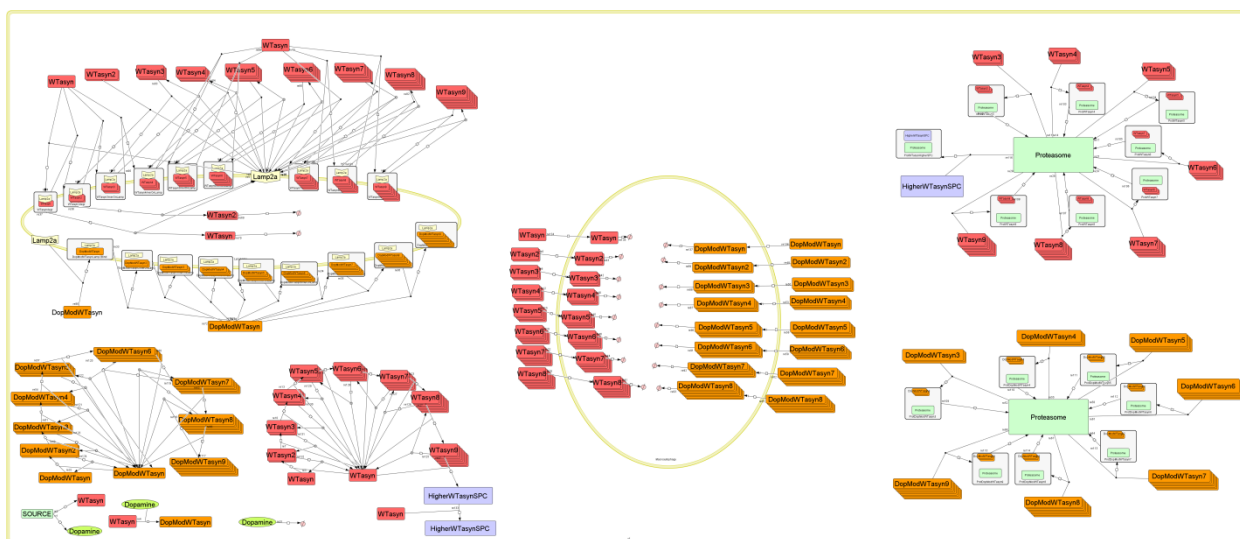
4.1.2 Δημιουργία της Δομής του μοντέλου

Για τη δημιουργία της δομής του μοντέλου ακολουθήθηκε μία διαδικασία δύο επιπέδων. Πρώτον, αξιοποιήθηκαν μέρη και αρχές μοντελοποίησης από προ-υπάρχοντα σχετικά μοντέλα και δεύτερον εισήχθησαν τα πρόσθετα μέρη ώστε να περιγράφονται τα παρατηρούμενα φαινόμενα που δεν είχαν προηγουμένως μοντελοποιηθεί ή δεν είχαν μοντελοποιηθεί με τρόπο ώστε να καλύπτουν τις ανάγκες ανάπτυξης του νέου μοντέλου. Στην ακόλουθη ενότητα, παρουσιάζεται η τελική δομή του μοντέλου και οι επιμέρους λεπτομέρειες αυτής, ενώ δίνονται οι συγκεκριμένες πηγές μοντέλων και οι βασικές παραδοχές που έγιναν με στόχο την απλοποίηση του και την αποδοτικότερη προσομοίωση, ανάλυση και εκπαίδευση του μοντέλου στη συνέχεια.

4.1.2.1 Η δομή του μοντέλου, πηγές γνώσεις και βασικές παραδοχές

Η μοντελοποίηση των βιολογικού συστήματος, επιλέχθηκε να γίνει έτσι ώστε να περιλαμβάνει πέντε βασικά τμήματα τα οποία παρότι είναι αλληλένδετα, αφού σε αυτά συμμετέχουν πολλές κοινές μοριακές οντότητες, έχουν σημαντικό βαθμό ανεξαρτησίας και μπορούν να τροποποιηθούν-επεκταθούν ανεξάρτητα. Τα πέντε βασικά αυτά τμήματα είναι:

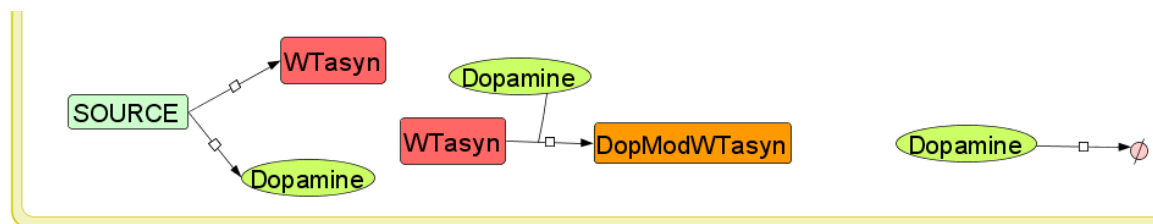
Ακολούθως δίνεται η συνολική άποψη της δομής του μοντέλου (η οποία δίνεται και σε μεγεθυμένη έκδοση στο Παράρτημα II) όπως αυτό σχεδιάστηκε στο εργαλείο Cell Designer([109], [110]), ενώ στις ακόλουθες ενότητες περιγράφονται οι επιμέρους λεπτομέρειες



Εικόνα 4.1: Συνολική δομή του μοντέλου υπερ-έκφρασης της ASYN και των σχετικών φαινομένων (σε SBGN)

4.1.2.1.1 Μοντελοποίηση παραγωγής και τροποποίησης της α-συνουκλεΐνης

Στην ακόλουθη εικόνα δίνεται η μοντελοποίηση της διαδικασίας παραγωγής της WT ASYN και της τροποποίησης αυτής από την Ντοπαμίνη (Dopamine).



Εικόνα 4.2 Τμήμα του μοντέλου. Παραγωγή WT ASYN και Dopamine και τροποποίηση της WT ASYN

Έχοντας ως βάση την αρχή μοντελοποίησης που ακολουθείται στην [111], η WT ASYN όπως και η Ντοπαμίνη παράγονται από μία πηγή (SOURCE) (αριστερό μέρος της εικόνας). Η SOURCE παραμένει μόνιμα σε σταθερό επίπεδο 1 ασχέτως του πόση WT ASYN ή Ντοπαμίνη έχει παραχθεί. Η συγκεκριμένη επιλογή τρόπου μοντελοποίησης βασίζεται στο ότι η έκφραση της WT ASYN στο κυτταρικό μοντέλο που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο γίνεται μέσω Tet-Off συστήματος και έτσι η ακριβής μοντελοποίηση της συγκεκριμένης διαδικασίας θεωρείται δύσκολη αλλά ίσως και ανέφικτη λόγω της μη δυνατότητας απόκτησης των αναγκαίων δεδομένων. Επίσης λόγω του σύνθετου της διαδικασίας παραγωγής της Ντοπαμίνης στους νευρώνες, επιλέχθηκε και αυτή να παράγεται μέσω της SOURCE. Έτσι, σε κάθε περίπτωση οι δύο μοριακές οντότητες παράγονται με σταθερό ρυθμό από τη στιγμή που δεν υπάρχει κάποια ένδειξη για την επιρροή αυτής της διαδικασίας από άλλους παράγοντες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη επιλογή μοντελοποίησης αποτελεί συνήθη πρακτική και αποδεικνύει την ευελιξία της μοντελοποίησης μέσω βιοχημικών δικτύων, στα οποία, όπως και εδώ, η μοντελοποίηση μπορεί να ακολουθεί λογική απλοποίησης.

Στη συνέχεια, η ταυτόχρονη παρουσία Ντοπαμίνης και WT ASYN οδηγεί στην δημιουργία μίας νέας οντότητας, της τροποποιημένης από Ντοπαμίνη μονομερούς WT ASYN με τη συμμετοχή ενός μορίου WT ASYN και ενός μορίου Dopamine (κεντρικό μέρος της εικόνας). Τέλος, η Ντοπαμίνη αποδομείται με σταθερό ρυθμό (δεξί μέρος της εικόνας).

Οι αντιδράσεις που αντιστοιχούν στο συγκεκριμένο τμήμα του μοντέλου δίνονται στο ακόλουθο πίνακα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αρίθμηση των αντιδράσεων βασίζεται στην αντίστοιχη αρίθμηση που έγινε αυτομάτως από τα εργαλεία Cell Designer και COPASI ενώ οι παράμετροι αυτές αφορούν σε κινητικούς νόμους mass action όπως αυτοί παρουσιάστηκαν σε προηγούμενες ενότητες και όπως θα σημειωθεί και κατά τον μαθηματικό ορισμό του μοντέλου. Όσον αφορά τις τιμές των παραμέτρων αυτών, αυτές αρχικοποιούνται και εκτιμώνται με τρόπο που περιγράφεται σε ακόλουθες ενότητες.

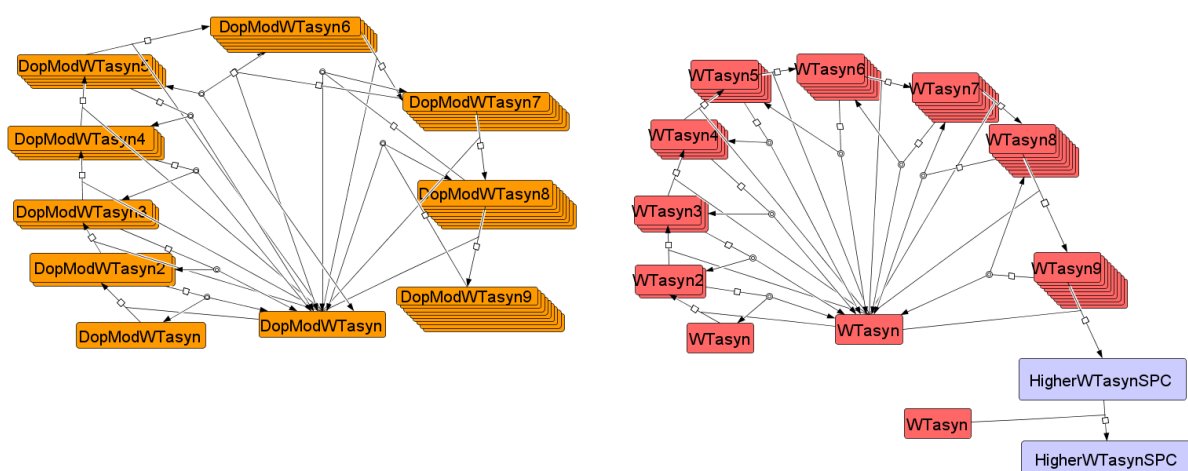
Πίνακας 4.1: Αντιδράσεις του τμήματος παραγωγής και τροποποίησης της α-συνουκλείνης

Αριθμός Αντίδρασης	Περιγραφή Αντίδρασης	Ονομασία Αντίδρασης στο μοντέλο	Αντίδραση	Παράμετρος
1	Παραγωγή WT ASYN	WTasynSynthesis	SOURCE -> WTasyn{Cytosol}	$k_{WTasynSynth}$
2	Παραγωγή Ντοπαμίνης	DopProduction	SOURCE -> Dopamine	$k_{DopProd}$
4	Τροποποίηση WT ASYN από Ντοπαμίνη	WTasynDopModification	WTasyn{Cytosol} + Dopamine -> DopModWTasyn{Cytosol}	$k_{WTasynDopMod}$
39	Αποδόμηση της Ντοπαμίνης	DopamineDegr	Dopamine -> Dopamine_degraded	$k_{DopDegr}$

4.1.2.1.2 Μοντελοποίηση του ολιγομερισμού της α-συνουκλείνης

Δεδομένων όσων παρουσιάστηκαν προηγουμένως για τον ολιγομερισμό της ASYN, επιλέχθηκε η μοντελοποίηση του συγκεκριμένου φαινομένου να είναι όσο το δυνατόν απλουστευμένη και σε σχετικό επίπεδο αφαίρεσης. Η συγκεκριμένη επιλογή έγινε με στόχο την αποφυγή υιοθέτησης κάποιας συγκεκριμένης παραδοχής και όσον αφορά τον ολιγομερισμό της ASYN αλλά και όσον αφορά την τροποποίηση αυτού από την Ντοπαμίνη, για τα οποία η διαθέσιμη γνώση προκύπτει κυρίως από *in vitro* μελέτες και είναι ακόμα άγνωστο το κατά πόσο μπορεί να θεωρηθεί ισχύουσα και για *in vivo* συστήματα. Έτσι, επιλέχθηκε η δημιουργία, η αύξηση (δημιουργία οντότητας μεγαλύτερου μοριακού βάρους, π.χ. από 3-μερές σε 4-μερές) αλλά και η μείωση των ολιγομερών (διάσπαση ολιγομερούς) να μοντελοποιηθεί μόνο με την προσθήκη ή αφαίρεση ενός μονομερούς, χωρίς να υποτίθεται ότι υπάρχει κάποιος μηχανισμός τροποποίησης της διαδικασίας ανάλογα με το βαθμό του ολιγομερούς (seeding step).

Στην ακόλουθη εικόνα παρουσιάζεται το τμήμα του μοντέλου που αναφέρεται στον ολιγομερισμό της ASYN.



Εικόνα 4.3 Τμήμα μοντέλου. Ολιγομερισμός της WT ASYN (σε SBGN)

Βασιζόμενοι στη μέθοδο μοντελοποίησης που υιοθετήθηκε στην [111], ορίζονται δύο πανομοιότυπες και παράλληλες διαδικασίες ολιγομερισμού. Η μία αφορά στον

ολιγομερισμό της ASYN και η άλλη στον ολιγομερισμό της τροποποιημένης ASYN. Η κύρια διαφορά μεταξύ των δύο διαδικασιών, έγκειται στο ότι η μη τροποποιημένη ASYN μπορεί να σχηματίσει και οντότητες μεγαλύτερες του 9-μερούς (ανώτερων μοριακών βαρών) οι οποίες θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως aggregates ή (proto-)fibrils (στο μοντέλο HigherWTasynSPC). Έπειτα από τον σχηματισμό μίας οντότητας HigherWTasynSPC, αυτή μπορεί συνεχώς να αυξάνεται με την προσθήκη μονομερών, ωστόσο, οι συγκεκριμένες οντότητες δεν μπορούν να διασπαστούν και να δημιουργήσουν οντότητες της κατηγορίας των ολιγομερών.

Η διαφορά σε σχέση με τα όσα μοντελοποιούνται στην [111] εντοπίζεται στο ότι αντί η δημιουργία των ανώτερων μοριακών βαρών οντοτήτων να θεωρείται ότι συμβαίνει από το 6-μερές και μετά, θεωρείται ότι συμβαίνει με τη προσθήκη ενός μονομερούς στο 9-μερές. Αυτή η επιλογή βασίζεται στα ευρήματα που παρουσιάζονται στην [87], όπου παρατηρούνται διαλυτές οντότητες ASYN με μοριακό βάρος ~130kDa.

Όσον αφορά τώρα τον ολιγομερισμό της DopModWTasyn, η διαδικασία είναι πανομοιότυπη με την διαφορά ότι μπορούν να δημιουργηθούν μέχρι και 9-μερή και όχι οντότητες υψηλότερου μοριακού βάρους.

Συνοπτικά, και για τις δύο διαδικασίες ισχύει ότι η προσθήκη ενός μονομερούς σε ένα μονομερές/διμερές/ολιγομερές οδηγεί στον σχηματισμό ενός διμερούς/3μερούς/ολιγομερούς υψηλότερης τάξης, ενώ η αφαίρεση ενός μονομερούς οδηγεί στην δημιουργία μίας οντότητας της αμέσως μικρότερης τάξης και την απελευθέρωση ενός μονομερούς στο κυτταρόπλασμα.

Οι αντίστοιχες αντιδράσεις δίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 4.2: Αντιδράσεις του τμήματος ολιγομερισμού της α-συνουκλείνης

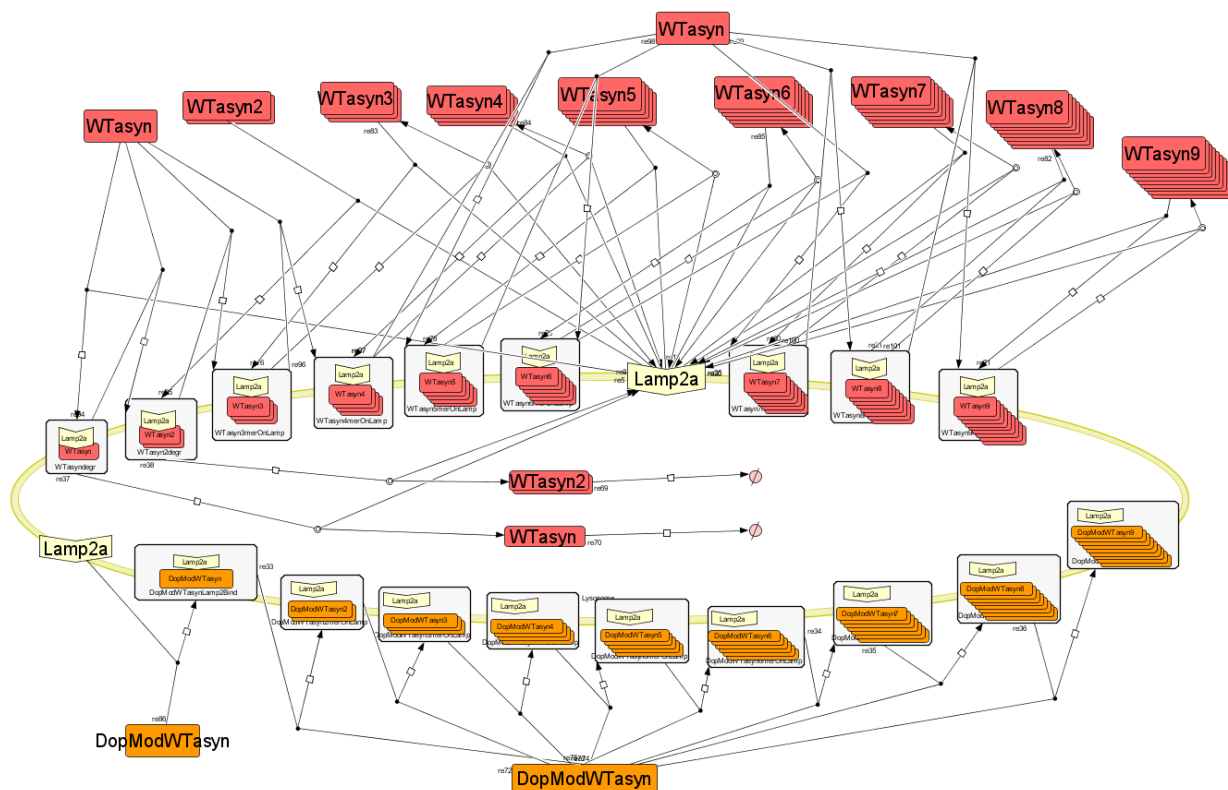
Αριθμός Αντίδρασης	Περιγραφή Αντίδρασης	Ονομασία Αντίδρασης στο μοντέλο	Αντίδραση	Παράμετρος
3	Σχηματισμός Διμερούς WT ASYN	2merForm	$2 * WTasyn\{Cytosol\} \rightarrow WTasyn2\{Cytosol\}$	$k_{WTasyn2merForm}$
8	Σχηματισμός Τριμερούς WT ASYN	3merForm	$WTasyn2\{Cytosol\} + WTasyn\{Cytosol\} \rightarrow WTasyn3\{Cytosol\}$	$k_{WTasyn3merForm}$
12	Σχηματισμός Τετραμερούς WT ASYN	4merForm	$WTasyn3\{Cytosol\} + WTasyn\{Cytosol\} \rightarrow WTasyn4\{Cytosol\}$	$k_{WTasyn4merForm}$
16	Σχηματισμός Πενταμερούς WT ASYN	5merForm	$WTasyn4\{Cytosol\} + WTasyn\{Cytosol\} \rightarrow WTasyn5\{Cytosol\}$	$k_{WTasyn5merForm}$
20	Σχηματισμός Εξαμερούς WT ASYN	6merForm	$WTasyn5\{Cytosol\} + WTasyn\{Cytosol\} \rightarrow WTasyn6\{Cytosol\}$	$k_{WTasyn6merForm}$
25	Σχηματισμός Επταμερούς WT ASYN	7merForm	$WTasyn6\{Cytosol\} + WTasyn\{Cytosol\} \rightarrow WTasyn7\{Cytosol\}$	$k_{WTasyn7merForm}$
29	Σχηματισμός Οκταμερούς WT ASYN	8merForm	$WTasyn7\{Cytosol\} + WTasyn\{Cytosol\} \rightarrow WTasyn8\{Cytosol\}$	$k_{WTasyn8merForm}$
34	Σχηματισμός	9merForm	$WTasyn8\{Cytosol\} + WTasyn\{Cytosol\} \rightarrow WTasyn9$	$k_{WTasyn9merForm}$

	Εννιαμερούς WT ASYN			
55	Σχηματισμός Οντότητας Υψηλού Μοριακού Βάρους/ Συσσωμάτιου	AggregForm	WTasyn9 + WTasyn{Cytosol} -> HigherWTasynSPC + WTasynInHigher	$k_{AggrForm}$
45	Εισαγωγή επιπλέον μονομερών στο Συσσωμάτιο	AggregGrowth	HigherWTasynSPC + WTasyn{Cytosol} -> HigherWTasynSPC + WTasynInHigher	$k_{AggrGrowth}$
6	Διάσπαση Διμερούς WT asyn	2merDis	WTasyn2{Cytosol} -> 2 * WTasyn{Cytosol}	$k_{WTasyn2merDis}$
10	Διάσπαση Τριμερούς WT asyn	3merDis	WTasyn3{Cytosol} -> WTasyn2{Cytosol} + WTasyn{Cytosol}	$k_{WTasyn3merDis}$
14	Διάσπαση Τετραμερούς WT ASYN	4merDis	WTasyn4{Cytosol} -> WTasyn3{Cytosol} + WTasyn{Cytosol}	$k_{WTasyn4merDis}$
18	Διάσπαση Πενταμερούς WT ASYN	5merDis	WTasyn5{Cytosol} -> WTasyn4{Cytosol} + WTasyn{Cytosol}	$k_{WTasyn5merDis}$
23	Διάσπαση Εξαμερούς WT ASYN	6merDis	WTasyn6{Cytosol} -> WTasyn5{Cytosol} + WTasyn{Cytosol}	$k_{WTasyn6merDis}$
27	Διάσπαση Επταμερούς WT ASYN	7merDis	WTasyn7{Cytosol} -> WTasyn6{Cytosol} + WTasyn{Cytosol}	$k_{WTasyn7merDis}$
32	Διάσπαση Οκταμερούς WT ASYN	8merDis	WTasyn8{Cytosol} -> WTasyn7{Cytosol} + WTasyn{Cytosol}	$k_{WTasyn8merDis}$
36	Διάσπαση 9μερούς WT ASYN	9merDis	WTasyn9 -> WTasyn8{Cytosol} + WTasyn{Cytosol}	$k_{WTasyn9merDis}$
40	Σχηματισμός Διμερούς Τροποποιημένης από Ντοπαμίνη WT ASYN	DopMod2merForm	2 * DopModWTasyn{Cytosol} -> DopModWTasyn2{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn2merForm}$
58	Σχηματισμός Τριμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN	DopMod3merForm	DopModWTasyn2{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol} -> DopModWTasyn3{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn3merForm}$
61	Σχηματισμός Τετραμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN	DopMod4merForm	DopModWTasyn3{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol} -> DopModWTasyn4{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn4merForm}$
65	Σχηματισμός Πενταμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN	DopMod5merForm	DopModWTasyn4{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol} -> DopModWTasyn5{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn5merForm}$
69	Σχηματισμός Εξαμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN	DopMod6merForm	DopModWTasyn5{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol} -> DopModWTasyn6{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn6merForm}$
73	Σχηματισμός Επταμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN	DopMod7merForm	DopModWTasyn6{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol} -> DopModWTasyn7{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn7merForm}$
77	Σχηματισμός Οκταμερούς	DopMod8merForm	DopModWTasyn7{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol} -> DopModWTasyn8{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn8merForm}$

	Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN			
81	Σχηματισμός Εννιαμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN	DopMod9merForm	DopModWTasyn8{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol} -> DopModWTasyn9	$k_{DopModWTasyn9merForm}$
56	Διάσπαση Διμερούς Τροποποιημένης από Ντοπαμίνη WT ASYN	DopMod2merDis	DopModWTasyn2{Cytosol} -> 2 * DopModWTasyn{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn2merDis}$
59	Διάσπαση Τριμερούς Τροποποιημένης από Ντοπαμίνη WT ASYN	DopMod3merDis	DopModWTasyn3{Cytosol} -> DopModWTasyn2{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn2merDis}$
63	Διάσπαση Τετραμερούς Τροποποιημένης από Ντοπαμίνη WT ASYN	DopMod4merDis	DopModWTasyn4{Cytosol} -> DopModWTasyn3{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn2merDis}$
67	Διάσπαση Πενταμερούς Τροποποιημένης από Ντοπαμίνη WT ASYN	DopMod5merDis	DopModWTasyn5{Cytosol} -> DopModWTasyn4{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn2merDis}$
71	Διάσπαση Εξαμερούς Τροποποιημένης από Ντοπαμίνη WT ASYN	DopMod6merDis	DopModWTasyn6{Cytosol} -> DopModWTasyn5{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn2merDis}$
75	Διάσπαση Επταμερούς Τροποποιημένης από Ντοπαμίνη WT ASYN	DopMod7merDis	DopModWTasyn7{Cytosol} -> DopModWTasyn6{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn2merDis}$
79	Διάσπαση Οκταμερούς Τροποποιημένης από Ντοπαμίνη WT ASYN	DopMod8merDis	DopModWTasyn8{Cytosol} -> DopModWTasyn7{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn2merDis}$
83	Διάσπαση Εννιαμερούς Τροποποιημένης από Ντοπαμίνη WT ASYN	DopMod9merDis	DopModWTasyn9 -> DopModWTasyn8{Cytosol} + DopModWTasyn{Cytosol}	$k_{DopModWTasyn2merDis}$

4.1.2.1.3 Μοντελοποίηση της αποδόμησης από τη διαμεσολαβούμενη από σαπερόνες αυτοφαγία και καταπίεση αυτής

Λαμβάνοντας υπόψη την διαθέσιμη σχετική γνώση για την αποδόμηση της ASYN από το CMA αλλά και για την καταπίεση αυτού όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 3, μοντελοποιήθηκαν τα σχετικά φαινόμενα όπως δίνονται στην παρακάτω εικόνα.



Εικόνα 4.4: Τμήμα μοντέλου. Αποδόμηση της ASYN από το CMA και η καταπίεση αυτού.

Όσον αφορά τη δημιουργία συμπλόκου μεταξύ ASYN και Lamp2a, η ιδέα υιοθετήθηκε από την [111], ωστόσο, όλη η υπόλοιπη μοντελοποίηση και όσα αναφέρονται στην συνέχεια του κειμένου, αποτελούν πρωτότυπες μορφές μοντελοποίησης.

Για την μοντελοποίηση των σχετικών με το CMA φαινομένων, ορίζεται ένα νέο διαμέρισμα (compartment) εντός του κυτάρου (δηλαδή εντός του κεντρικού διαμερίσματος που αναπαριστά το κυτταρόπλασμα), που αναπαριστά τα λυσοσώματα. Στην μεμβράνη του συγκεκριμένου διαμερίσματος βρίσκονται οι υποδοχείς Lamp2a (με αριθμό που ορίζεται από τις ρυθμίσεις του μοντέλου) οι οποίοι ορίζονται ως διαμεμβρανικές οντότητες και έτσι μπορούν να αλληλεπιδρούν και με τον χώρο έξω από το συγκεκριμένο διαμέρισμα (κυτταρόπλασμα) αλλά και με τον εσωτερικό χώρο του διαμερίσματος.

Συγκεκριμένα, με βάση τη γνώση από την [98], η μονομερής αλλά και η διμερής ASYN (WTAsyn και WTAsyn2 που εμφανίζονται με κόκκινο χρώμα) μπορούν να προσδεθούν στον Lamp2a δημιουργώντας ένα σύμπλοκο με αυτόν και στη συνέχεια να αποδεσμευτούν εισερχόμενες στο διαμέρισμα του λυσοσώματος και απελευθερώνοντας τον Lamp2a που χρησιμοποιήθηκε. Εφόσον τα συγκεκριμένα μόρια εισαχθούν στο

διαμέρισμα, αυτά αποδομούνται και μέχρι να συμβεί αυτό δεν επηρεάζουν την εξέλιξη του υπόλοιπου συστήματος.

Τα ολιγομερή, τώρα, της μη τροποποιημένης ASYN (WTasyn3...9), μπορούν να προσδεθούν και αυτά στον Lamp2a, ωστόσο δεν μπορούν να εισαχθούν στο διαμέρισμα του λυσοσώματος αλλά με μία αντίστροφη αντίδραση μπορούν να αποδεσμευτούν από τον υποδοχέα. Κατά το χρονικό διάστημα που τα ολιγομερή είναι δεσμευμένα από τον Lamp2a, δεν επιτρέπεται από τον συγκεκριμένο υποδοχέα η δέσμευση άλλων οντοτήτων.

Τέλος, βάσει των γνώσεων που αντλήθηκαν από την [98] αλλά και μέσω των συμβουλών από τα μέλη του εργαστηρίου, επιλέχθηκε η μοντελοποίηση του φαινομένου της δημιουργίας ολιγομερών και κατά τη διάρκεια παραμονής οντοτήτων ASYN στον Lamp2a. Ωστόσο, και αυτά τα ολιγομερή δεν θεωρείται ότι καταπιέζουν το CMA μιας και ελευθερώνονται με την σχετική αντίδραση όπως προαναφέρθηκε.

Όσον αφορά τώρα την τροποποιημένη από Ντοπαμίνη ASYN (DopModWTasyn), το μονομερές αυτής, μπορεί να προσδεθεί στο Lamp2a αλλά δεν μπορεί να εισέλθει στο διαμέρισμα του λυσοσώματος και να αποδομηθεί, καταπιέζοντας έτσι τη λειτουργία του υποδοχέα. Επίσης, η ίδια διαδικασία ολιγομερισμού επί της μεμβράνης/υποδοχέα ισχύει και για την τροποποιημένη ASYN. Ωστόσο, εφόσον έχουν δημιουργηθεί τροποποιημένα ολιγομερή, αυτά δεν μπορούν να αποδεσμευτούν και καταστέλλουν μόνιμα τον υποδοχέα Lamp2a.

Στον ακόλουθο πίνακα δίνονται συμπερασματικά οι σχετικές με αυτό το τμήμα του μοντέλου αντιδράσεις.

Πίνακας 4.3: Αντιδράσεις του τμήματος αποδόμησης από τη διαμεσολαβούμενη από σαπερόνες αυτοφαγία και καταπίεσης αυτής

Αριθμός Αντίδρασης	Περιγραφή Αντίδρασης	Ονομασία Αντίδρασης στο μοντέλο	Αντίδραση	Παράμετρος
5	Πρόσδεση Μονομερούς WT ASYN στον Lamp2a	WTasynLampBind	WTasyn{Cytosol} + Lamp2a -> WTasyndegr	$K_{WTasynrLampBind}$
9	Πρόσδεση Διμερούς WT ASYN στον Lamp2a	WTasyn2LampBind	WTasyn2{Cytosol} + Lamp2a -> WTasyn2degr	$K_{WTasynr2merLampBind}$
99	Πρόσδεση Τριμερούς WT ASYN στον Lamp2a	WTasyn3merBindOnLamp	Lamp2a + WTasyn3{Cytosol} -> WTasyn3merOnLamp	$K_{WTasynr3merLampBind}$
100	Πρόσδεση Τετραμερούς WT ASYN στον Lamp2a	WTasyn4merBindOnLamp	Lamp2a + WTasyn4{Cytosol} -> WTasyn4merOnLamp	$K_{WTasynr4merLampBind}$
22	Πρόσδεση Πενταμερούς WT ASYN στον Lamp2a	WTasyn5merBindOnLamp	WTasyn5{Cytosol} + Lamp2a -> WTasyn5merOnLamp	$K_{WTasynr5merLampBind}$
101	Πρόσδεση Εξαμερούς WT ASYN στον	WTasyn6merBindOnLamp	Lamp2a + WTasyn6{Cytosol} -> WTasyn6merOnLamp	$K_{WTasynr6merLampBind}$

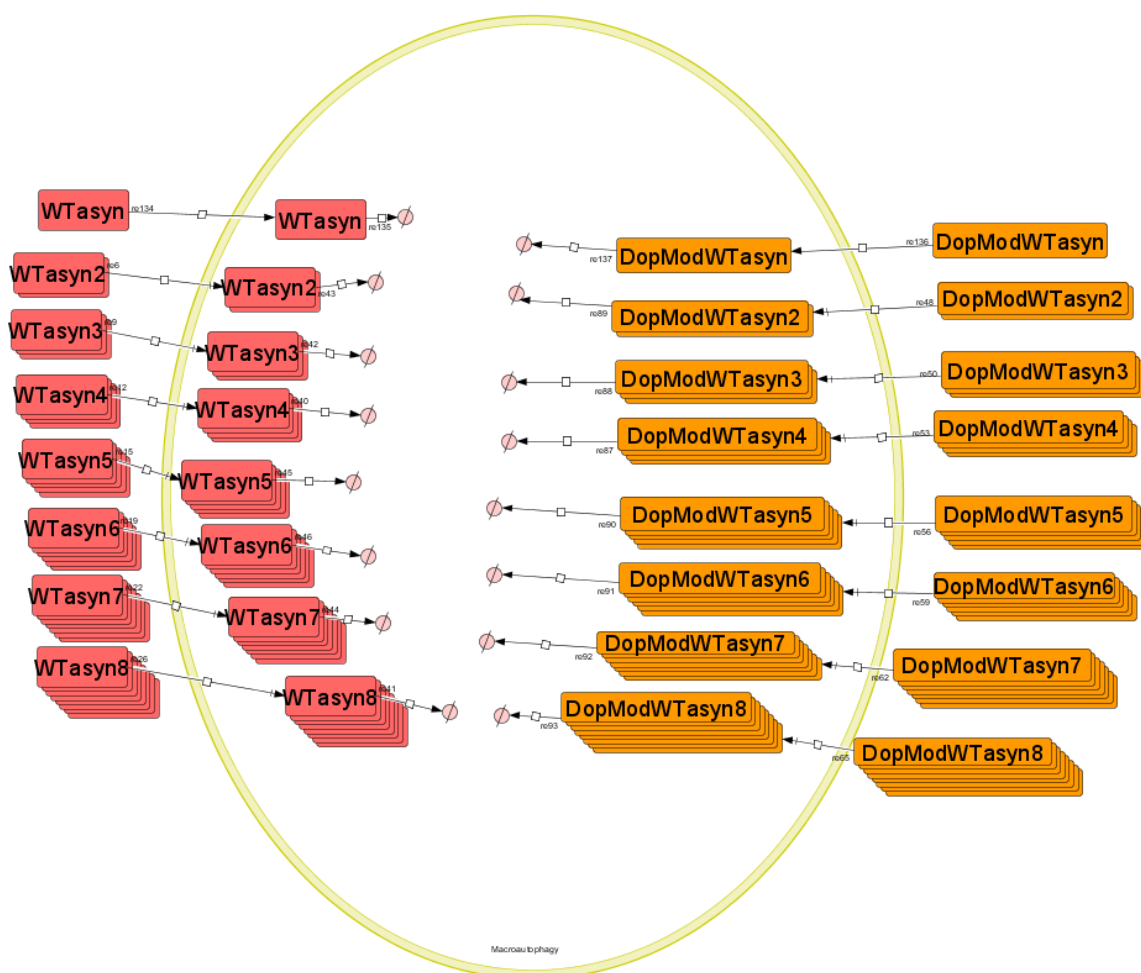
	Lamp2a			
31	Πρόσδεση Επταμερούς WT ASYN στον Lamp2a	WTasyn7merBindOnLamp	WTasyn7{Cytosol} + Lamp2a -> WTasyn7merOnLamp	<i>K_{WTasyn7merLampBind}</i>
98	Πρόσδεση Οκταμερούς WT ASYN στον Lamp2a	WTasyn8merBindOnLamp	WTasyn8merOnLamp + WTasyn8{Cytosol} -> Lamp2a	<i>K_{WTasyn8merLampBind}</i>
38	Πρόσδεση Εννιαμερούς WT ASYN στον Lamp2a	WTasyn9merBindOnLamp	WTasyn9 + Lamp2a -> WTasyn9merOnLamp	<i>K_{WTasyn9merLampBind}</i>
46	Εισαγωγή Μονομερούς WT ASYN στο Λυσόσωμα	WTasynLysosUptake	WTasyndegr -> Lamp2a + WTasyn{Lysosome}	<i>K_{WTasynLysUptk}</i>
47	Εισαγωγή Διμερούς WT ASYN στο Λυσόσωμα	WTasyn2LysosUptake	WTasyn2degr -> Lamp2a + WTasyn2{Lysosome}	<i>K_{WTasyn2LysUptk}</i>
86	Αποδόμηση Μονομερούς WT ASYN στο Λυσόσωμα	WTasyn1merCMADegr	WTasyn{Lysosome} -> WTasynCMADegr	<i>K_{WTasynLysDegr}</i>
85	Αποδόμηση Διμερούς WT ASYN στο Λυσόσωμα	WTasyn2merCMADegr	WTasyn2{Lysosome} -> WTasyn2merCMADegr	<i>K_{WTasyn2merLysDegr}</i>
92	Αποδέσμευση Τριμερούς WT ASYN από τον Lamp2a	LampFree3merWT	WTasyn3merOnLamp -> WTasyn3{Cytosol} + Lamp2a	<i>K_{WTasyn3merLampFree}</i>
93	Αποδέσμευση Τετραμερούς WT ASYN από τον Lamp2a	LampFree4merWT	WTasyn4merOnLamp -> WTasyn4{Cytosol} + Lamp2a	<i>K_{WTasyn4merLampFree}</i>
94	Αποδέσμευση Πενταμερούς WT ASYN από τον Lamp2a	LampFree5merWT	WTasyn5merOnLamp -> WTasyn5{Cytosol} + Lamp2a	<i>K_{WTasyn5merLampFree}</i>
95	Αποδέσμευση Εξαμερούς WT ASYN από τον Lamp2a	LampFree6merWT	WTasyn6merOnLamp -> WTasyn6{Cytosol} + Lamp2a	<i>K_{WTasyn6merLampFree}</i>
96	Αποδέσμευση Επταμερούς WT ASYN από τον Lamp2a	LampFree7merWT	WTasyn7merOnLamp -> WTasyn7{Cytosol} + Lamp2a	<i>K_{WTasyn7merLampFree}</i>
97	Αποδέσμευση Οκταμερούς WT ASYN από τον Lamp2a	LampFree8merWT	WTasyn8merOnLamp -> WTasyn8{Cytosol} + Lamp2a	<i>K_{WTasyn8merLampFree}</i>
98	Αποδέσμευση Εννιαμερούς WT ASYN από τον Lamp2a	LampFree9merWT	WTasyn9merOnLamp -> WTasyn9 + Lamp2a	<i>K_{WTasyn9merLampFree}</i>
110	Σχηματισμός Διμερούς WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn2merFormOnLamp	WTasyn{Cytosol} + WTasyndegr -> WTasyn2degr	<i>K_{WTasyn2merLampForm}</i>
111	Σχηματισμός Τριμερούς WT ASYN επί του	WTasyn3merFormOnLamp	WTasyn{Cytosol} + WTasyn2degr -> WTasyn3merOnLamp	<i>K_{WTasyn3merLampForm}</i>

	Lamp2a			
112	Σχηματισμός Τετραμερών WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn4merFormOnLamp	WTasyn{Cytosol} + WTasyn3merOnLamp -> WTasyn4merOnLamp	$K_{WTasyn4merLampForm}$
113	Σχηματισμός Πενταμερών WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn5merFormOnLamp	WTasyn{Cytosol} + WTasyn4merOnLamp -> WTasyn5merOnLamp	$K_{WTasyn5merLampForm}$
114	Σχηματισμός Εξαμερών WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn6merFormOnLamp	WTasyn5merOnLamp + WTasyn{Cytosol} -> WTasyn6merOnLamp	$K_{WTasyn6merLampForm}$
115	Σχηματισμός Επταμερών WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn7merFormOnLamp	WTasyn6merOnLamp + WTasyn{Cytosol} -> WTasyn7merOnLamp	$K_{WTasyn7merLampForm}$
116	Σχηματισμός Οκταμερών WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn8merFormOnLamp	WTasyn{Cytosol} + WTasyn7merOnLamp -> WTasyn8merOnLamp	$K_{WTasyn8merLampForm}$
117	Σχηματισμός Εννιαμερών WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn9merFormOnLamp	WTasyn{Cytosol} + WTasyn8merOnLamp -> WTasyn9merOnLamp	$K_{WTasyn9merLampForm}$
102	Πρόσδεση Τροποποιημένης από Ντοπαμίνη WT ASYN στον Lamp2a και καταπίεση αυτού	DopModWTasynCMAInhibition	Lamp2a + DopModWTasyn{Cytosol} -> DopModWTasynOnLamp	$K_{DopModWTasynLampBind}$
110	Σχηματισμός Τροπ. από Ντοπ. Διμερών WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn2merFormOnLamp	WTasyn{Cytosol} + WTasyn2degr -> WTasyn2degr	$K_{DopModWTasyn2merFormLamp}$
111	Σχηματισμός Τροπ. από Ντοπ. Τριμερών WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn3merFormOnLamp	WTasyn{Cytosol} + WTasyn2degr -> WTasyn3merOnLamp	$K_{DopModWTasyn3merFormLamp}$
112	Σχηματισμός Τροπ. από Ντοπ. Τετραμερών WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn4merFormOnLamp	WTasyn{Cytosol} + WTasyn3merOnLamp -> WTasyn4merOnLamp	$K_{DopModWTasyn4merFormLamp}$
113	Σχηματισμός Τροπ. από Ντοπ. Πενταμερών WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn5merFormOnLamp	WTasyn{Cytosol} + WTasyn4merOnLamp -> WTasyn5merOnLamp	$K_{DopModWTasyn5merFormLamp}$
114	Σχηματισμός Τροπ. από Ντοπ. Εξαμερών WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn6merFormOnLamp	WTasyn5merOnLamp + WTasyn{Cytosol} -> WTasyn6merOnLamp	$K_{DopModWTasyn6merFormLamp}$
115	Σχηματισμός Τροπ. από Ντοπ. Επταμερών WT ASYN επί του	WTasyn7merFormOnLamp	WTasyn6merOnLamp + WTasyn{Cytosol} -> WTasyn7merOnLamp	$K_{DopModWTasyn7merFormLamp}$

	Lamp2a			
116	Σχηματισμός Τροπ. από Ντοπ. Οκταμερούς WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn8merFormOnLamp	WTasyn{Cytosol} + WTasyn7merOnLamp -> WTasyn8merOnLamp	$k_{DopModWTasyn8merFormLamp}$
117	Σχηματισμός Τροπ. από Ντοπ. Εννιαμερούς WT ASYN επί του Lamp2a	WTasyn9merFormOnLamp	WTasyn{Cytosol} + WTasyn8merOnLamp -> WTasyn9merOnLamp	$k_{DopModWTasyn9merFormLamp}$

4.1.2.1.4 Μοντελοποίηση της αποδόμησης από την μακροαυτοφαγία

Έχοντας ως βάση τα όσα παρουσιάστηκαν στην ενότητα 3.2.3.3.2 σχετικά με την αποδόμηση της ASYN από την μακροαυτοφαγία, δομήθηκε το παρακάτω τμήμα του μοντέλου που αφορά στην συμμετοχή αυτού του πρωτεολυτικού μηχανισμού.



Εικόνα 4.5: Τμήμα μοντέλου. Αποδόμηση της ASYN από την Μακροαυτοφαγία (σε SBGN)

Όπως είναι εμφανές στην παραπάνω εικόνα, δημιουργήθηκε ένα νέο διαμέρισμα το οποίο αναπαριστά την δομή του αυτοφαγοσώματος. Επειδή η διαδικασία σχηματισμού του αυτοφαγοσώματος (και κατόπιν του αυτοφαγολυσώματος) θεωρείται ιδιαίτερα σύνθετη και η μοντελοποίησή της ξεφεύγει από τα πλαίσια της παρούσας εργασίας, με στόχο της απλοποίησης του μοντέλου, θεωρείται ότι το συγκεκριμένο διαμέρισμα

αποτελεί ένα μόνιμο αυτοφαγόσωμα το οποίο εσωτερικεύει τις προς αποδόμηση οντότητες και είναι υπεύθυνο για την αποδόμηση που συμβαίνει μέσω της μακροαυτοφαγίας. Εφόσον οι εν λόγω οντότητες εισαχθούν στο διαμέρισμα, μέσω της αντίστοιχης αντίδρασης μεταφοράς, τότε με μία δεύτερη αντίδραση αποδομούνται. Η επιλογή της δημιουργίας ειδικού διαμερίσματος για την μακροαυτοφαγία, καθορίστηκε από την ανάγκη οι οντότητες που θα οδηγηθούν προς αποδόμηση (ισοδύναμα θα εισάγονταν στο αυτοφαγόσωμα) να μην μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλες οντότητες του συστήματος. Επί παραδείγματι, στην συγκεκριμένη περίπτωση της ASYN, η είσοδος στο διαμέρισμα διασφαλίζει ότι η συγκεκριμένη οντότητα, δεν θα συμμετάσχει στο σχηματισμό ή διεύρυνση ενός ολιγομερούς ενώ έχει επιλεγεί προς αποδόμηση.

Όπως είναι εμφανές στην παραπάνω εικόνα, η διαδικασία εισόδου και αποδόμησης είναι πανομοιότυπη για όλες τις μορφές της ASYN είτε όσον αφορά την ολιγομερισμένη ή μη μορφή της είτε την τροποποιημένη από Ντοπαμίνη ή μη μορφή της.

Τέλος, όπως σημειώθηκε και στην προαναφερθείσα ενότητα, στην συγκεκριμένη διαδικασία συμμετέχουν τα μονομερή μέχρι και τα 8-μερή της ASYN σε τροποποιημένη αλλά και μη τροποποιημένη μορφή.

Οι αντιδράσεις που αντιστοιχούν στο συγκεκριμένο τμήμα του μοντέλου δίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 4.4: Αντιδράσεις του τμήματος αποδόμησης από την μακροαυτοφαγία

Αριθμός Αντίδρασης	Περιγραφή Αντίδρασης	Ονομασία Αντίδρασης στο μοντέλο	Αντίδραση	Παράμετρος
133	Εισαγωγή Μονομερούς WT ASYN στο Διαμέρισμα Μακροαυτοφαγίας (M/A)	AutophagosomeUptakeWTasy n	WTasy n{Cytosol} -> WTasy n{M/autophagy&OtherLysDegrPath}	$K_{WTasy nAutophUptk}$
7	Εισαγωγή Διμερούς WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	AutophagosomeUptakeWTasy n2mer	WTasy n2{Cytosol} -> WTasy n2{M/autophagy&OtherLysDegrPath}	$K_{WTasy n2merAutophUptk}$
11	Εισαγωγή Τριμερούς WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	AutophagosomeUptakeWTasy n3mer	WTasy n3{Cytosol} -> WTasy n3{M/autophagy&OtherLysDegrPath}	$K_{WTasy n3merAutophUptk}$
15	Εισαγωγή Τετραμερούς WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	AutophagosomeUptakeWTasy n4mer	WTasy n4{Cytosol} -> WTasy n4{M/autophagy&OtherLysDegrPath}	$K_{WTasy n4merAutophUptk}$
19	Εισαγωγή Πενταμερούς WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	AutophagosomeUptakeWTasy n5mer	WTasy n5{Cytosol} -> WTasy n5{M/autophagy&OtherLysDegrPath}	$K_{WTasy n5merAutophUptk}$
24	Εισαγωγή Εξαμερούς WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	AutophagosomeUptakeWTasy n6mer	WTasy n6{Cytosol} -> WTasy n6{M/autophagy&OtherLysDegrPath}	$K_{WTasy n6merAutophUptk}$
28	Εισαγωγή Επταμερούς WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	AutophagosomeUptakeWTasy n7mer	WTasy n7{Cytosol} -> WTasy n7{M/autophagy&OtherLysDegrPath}	$K_{WTasy n7merAutophUptk}$

33	Εισαγωγή Οκταμερούς WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	AutophagosomeUptakeWTasy n8mer	WTasyn8{Cytosol} -> WTasyn8{M/autophagy&OtherLysDegrPath}	$k_{WTasyn8merAutophUptk}$
136	Αποδόμηση Μονομερούς WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyWTasynDegr	WTasyn{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> WTasynmerM/Adegr	$k_{WTasynM/Adegr}$
51	Αποδόμηση Διμερούς WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyWTasyn2Degr	WTasyn2{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> WTasyn2merM/Adegr	$k_{WTasyn2merM/Adegr}$
50	Αποδόμηση Τριμερούς WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyWTasyn3Degr	WTasyn3{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> WTasyn3merM/Adegr	$k_{WTasyn3merM/Adegr}$
48	Αποδόμηση Τετραμερούς WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyWTasyn4Degr	WTasyn4{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> WTasyn4merM/Adegr	$k_{WTasyn4merM/Adegr}$
53	Αποδόμηση Πενταμερούς WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyWTasyn5Degr	WTasyn5{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> WTasyn5merM/Adegr	$k_{WTasyn5merM/Adegr}$
54	Αποδόμηση Εξαμερούς WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyWTasyn6Degr	WTasyn6{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> WTasyn6merM/Adegr	$k_{WTasyn6merM/Adegr}$
52	Αποδόμηση Επταμερούς WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyWTasyn7Degr	WTasyn7{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> WTasyn7merM/Adegr	$k_{WTasyn7merM/Adegr}$
49	Αποδόμηση Οκταμερούς WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyWTasyn8Degr	WTasyn8{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> WTasyn8merM/Adegr	$k_{WTasyn8merM/Adegr}$
134	Εισαγωγή Μονομερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Διαμέρισμα Μακροαυτοφαγίας (M/A)	DopModAutophagosomeUptak e	DopModWTasyn{Cytosol} -> DopModWTasyn{M/autophagy&OtherLysDegrP ath}	$k_{DopModAutophUptk}$
57	Εισαγωγή Διμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	DopModAutophagosomeUptak e2mer	DopModWTasyn2{Cytosol} -> DopModWTasyn2{M/autophagy&OtherLysDegr Path}	$k_{DopMod2merAutophUptk}$
60	Εισαγωγή Τριμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	DopModAutophagosomeUptak e3mer	DopModWTasyn3{Cytosol} -> DopModWTasyn3{M/autophagy&OtherLysDegr Path}	$k_{DopMod3merAutophUptk}$
64	Εισαγωγή Τετραμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	DopModAutophagosomeUptak e4mer	DopModWTasyn4{Cytosol} -> DopModWTasyn4{M/autophagy&OtherLysDegr Path}	$k_{DopMod4merAutophUptk}$
68	Εισαγωγή Πενταμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	DopModAutophagosomeUptak e5mer	DopModWTasyn5{Cytosol} -> DopModWTasyn5{M/autophagy&OtherLysDegr Path}	$k_{DopMod5merAutophUptk}$
72	Εισαγωγή Εξαμερούς Τροπ.	DopModAutophagosomeUptak e6mer	DopModWTasyn6{Cytosol} -> DopModWTasyn6{M/autophagy&OtherLysDegr	$k_{DopMod6merAutophUptk}$

	από Ντοπ. WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)		Path}	
76	Εισαγωγή Επταμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	DopModAutophagosomeUptake7mer	DopModWTasyn7{Cytosol} -> DopModWTasyn7{M/autophagy&OtherLysDegrPath}	$k_{DopMod7merAutophUptk}$
80	Εισαγωγή Οκταμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Διαμέρισμα (M/A)	DopModAutophagosomeUptake8mer	DopModWTasyn8{Cytosol} -> DopModWTasyn8{M/autophagy&OtherLysDegrPath}	$k_{DopMod8merAutophUptk}$
135	Αποδόμηση Μονομερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyDopModWTasyn1Degr	DopModWTasyn{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> DopModWTasyn1merM/Adegr	$k_{DopModM/Adegr}$
105	Αποδόμηση Διμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyDopModWTasyn2Degr	DopModWTasyn2{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> DopModWTasyn2merM/Adegr	$k_{DopMod2merM/Adegr}$
104	Αποδόμηση Τριμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyDopModWTasyn3Degr	DopModWTasyn3{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> DopModWTasyn3merM/Adegr	$k_{DopMod3merM/Adegr}$
103	Αποδόμηση Τετραμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyDopModWTasyn4Degr	DopModWTasyn4{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> DopModWTasyn4merM/Adegr	$k_{DopMod4merM/Adegr}$
106	Αποδόμηση Πενταμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyDopModWTasyn5Degr	DopModWTasyn5{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> DopModWTasyn5merM/Adegr	$k_{DopMod5merM/Adegr}$
107	Αποδόμηση Εξαμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyDopModWTasyn6Degr	DopModWTasyn6{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> DopModWTasyn6merM/Adegr	$k_{DopMod6merM/Adegr}$
108	Αποδόμηση Επταμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyDopModWTasyn7Degr	DopModWTasyn7{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> DopModWTasyn7merM/Adegr	$k_{DopMod7merM/Adegr}$
109	Αποδόμηση Οκταμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από τη Μακροαυτοφαγία	M/autophagyDopModWTasyn8Degr	DopModWTasyn8{M/autophagy&OtherLysDegrPath} -> DopModWTasyn8merM/Adegr	$k_{DopMod8merM/Adegr}$

4.1.2.1.5 Μοντελοποίηση της αποδόμησης από το πρωτεάσωμα και της καταπίεσης αυτού

Έχοντας ως βάση τα όσα παρουσιάστηκαν στην Ενότητα 3.2.3.3.3, για την μοντελοποίηση των φαινομένων που εμπλέκουν το πρωτεάσωμα και την ASYN, δημιουργήθηκαν και εδώ δύο παράλληλες διαδικασίες. Η μία διαδικασία αφορά στα σχετικά με την τροποποιημένη από Ντοπαμίνη WT ASYN, φαινόμενα, και η άλλη σε αυτά που σχετίζονται με την μη τροποποιημένη WT ASYN και τις μοριακές οντότητες υψηλού μοριακού βάρους που μπορεί να δημιουργήσει. Το σχετικό μέρος του μοντέλου δίνεται στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 4.6 Τμήμα μοντέλου. Αποδόμηση των ολιγομερών της ASYN από το πρωτεάσωμα και καταπίεση αυτού (σε SBGN)

Και για τις δύο μορφές της ASYN ισχύει ότι τα 3-μερή μέχρι και τα 9-μερή [104] μπορούν να δημιουργήσουν σύμπλοκο με το πρωτεάσωμα και σταδιακά να αποδομηθούν από αυτά, απελευθερώνοντάς (η αντίδραση της απελευθέρωσης, οδηγεί και σε εξαφάνιση του δεσμευμένου ολιγομερούς) το. Έτσι όπως ορίζει η διαθέσιμη γνώση αλλά και η εργαστηριακή εμπειρία, τα ολιγομερή της ASYN διαταράσσουν τη λειτουργία του πρωτεασώματος υπερ-απασχολώντας το, ωστόσο, αυτή η διαταραχή δεν είναι μόνιμη και διαρκεί όσο χρόνο χρειάζεται για να αποδομηθεί το δεσμευμένο ολιγομερές. Αντιθέτως, οι οντότητες υψηλού μοριακού βάρους, επίσης δημιουργούν σύμπλοκο με το πρωτεάσωμα, αλλά δεν μπορούν να αποδεσμεύουν από αυτό, καταστέλλοντας το μόνιμα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι και για τον συγκεκριμένο μηχανισμό, για λόγους απλούστευσης του μοντέλου, η διαδικασία αποδόμησης πρωτεΐνων από το πρωτεάσωμα έχει απλοποιηθεί σημαντικά σε σχέση με τα όσα παρουσιάστηκαν στην αρχή της ενότητας.

Οι αντιδράσεις που αναφέρονται σε αυτό το τμήμα του μοντέλου δίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 4.5: Αντιδράσεις του τμήματος της αποδόμησης από το πρωτεάσωμα και της καταπίεσής αυτού

Αριθμός Αντίδρασης	Περιγραφή Αντίδρασης	Ονομασία Αντίδρασης στο μοντέλο	Αντίδραση	Παράμετρος
13	Δέσμευση Τριμερούς WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	3merProtBind	WTasyn3{Cytosol} + Proteasome -> ProtWTasyn3	$K_{WTasyn3merProtBind}$
17	Δέσμευση Τετραμερούς WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	4merProtBind	WTasyn4{Cytosol} + Proteasome -> ProtWTasyn4	$K_{WTasyn4merProtBind}$
21	Δέσμευση Πενταμερούς WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	5merProtBind	WTasyn5{Cytosol} + Proteasome -> ProtWTasyn5	$K_{WTasyn5merProtBind}$
26	Δέσμευση Εξαμερούς WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	6merProtBind	WTasyn6{Cytosol} + Proteasome -> ProtWTasyn6	$K_{WTasyn6merProtBind}$
30	Δέσμευση Επταμερούς WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	7merProtBind	WTasyn7{Cytosol} + Proteasome -> ProtWTasyn7	$K_{WTasyn7merProtBind}$
35	Δέσμευση Οκταμερούς WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	8merProtBind	WTasyn8{Cytosol} + Proteasome -> ProtWTasyn8	$K_{WTasyn8merProtBind}$
37	Δέσμευση Εννιαμερούς WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	9merProtBind	WTasyn9 + Proteasome -> ProtWTasyn9	$K_{WTasyn9merProtBind}$
118	Αποδόμηση Τριμερούς WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree3merWT	ProtWTasyn3 -> Proteasome	$K_{WTasyn3merProtFree}$
119	Αποδόμηση Τετραμερούς WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree4merWT	ProtWTasyn4 -> Proteasome	$K_{WTasyn4merProtFree}$

120	Αποδόμηση Πενταμερών WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree5merWT	ProtWTasyn5 -> Proteasome	$K_{WTasyn5merProtFree}$
121	Αποδόμηση Εξαμερών WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree6merWT	ProtWTasyn6 -> Proteasome	$K_{WTasyn6merProtFree}$
122	Αποδόμηση Επταμερών WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree7merWT	ProtWTasyn7 -> Proteasome	$K_{WTasyn7merProtFree}$
123	Αποδόμηση Οκταμερών WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree8merWT	ProtWTasyn8 -> Proteasome	$K_{WTasyn8merProtFree}$
124	Αποδόμηση Εννιαμερών WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree9merWT	ProtWTasyn9 -> Proteasome	$K_{WTasyn9merProtFree}$
132	Δέσμευση Οντότητας Υψηλού Μοριακού Βάρους στο Πρωτεάσωμα και καταπίεση	WTasynHigherSPCprotInh	HigherWTasynSPC + Proteasome -> ProtWTasynHigherSPC	$K_{WTasynHighProtBind}$
62	Δέσμευση Τριμερών Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	DopMod3merProtBind	DopModWTasyn3{Cytosol} + Proteasome -> ProtDopModWTasyn3	$K_{DopMod3merProtBind}$
66	Δέσμευση Τετραμερών Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	DopMod4merProtBind	DopModWTasyn4{Cytosol} + Proteasome -> ProtDopModWTasyn4	$K_{DopMod4merProtBind}$
70	Δέσμευση Πενταμερών Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	DopMod5merProtBind	DopModWTasyn5{Cytosol} + Proteasome -> ProtDopModWTasyn5	$K_{DopMod5merProtBind}$
74	Δέσμευση Εξαμερών Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	DopMod6merProtBind	DopModWTasyn6{Cytosol} + Proteasome -> ProtDopModWTasyn6	$K_{DopMod6merProtBind}$
78	Δέσμευση Επταμερών Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	DopMod7merProtBind	DopModWTasyn7{Cytosol} + Proteasome -> ProtDopModWTasyn7	$K_{DopMod7merProtBind}$
82	Δέσμευση Οκταμερών Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN στο Πρωτεάσωμα	DopMod8merProtBind	DopModWTasyn8{Cytosol} + Proteasome -> ProtDopModWTasyn8	$K_{DopMod8merProtBind}$
84	Δέσμευση Εννιαμερών Τροπ. από Ντοπ. WT	DopMod9merProtBind	DopModWTasyn9 + Proteasome -> ProtDopModWTasyn9	$K_{DopMod9merProtBind}$

	ASYN στο Πρωτεάσωμα			
125	Αποδόμηση Τριμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree3merDopWT	ProtDopModWTasyn3 -> Proteasome	$k_{DopMod3merProtFree}$
126	Αποδόμηση Τετραμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree4merDopWT	ProtDopModWTasyn4 -> Proteasome	$k_{DopMod4merProtFree}$
127	Αποδόμηση Πενταμερούς WT ASYN Τροπ. από Ντοπ. από το Πρωτεάσωμα	ProtFree5merDopWT	ProtDopModWTasyn5 -> Proteasome	$k_{DopMod5merProtFree}$
128	Αποδόμηση Εξαμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree6merDopWT	ProtDopModWTasyn6 -> Proteasome	$k_{DopMod6merProtFree}$
129	Αποδόμηση Επταμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree7merDopWT	ProtDopModWTasyn7 -> Proteasome	$k_{DopMod7merProtFree}$
130	Αποδόμηση Οκταμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree8merDopWT	ProtDopModWTasyn8 -> Proteasome	$k_{DopMod8merProtFree}$
131	Αποδόμηση Εννιαμερούς Τροπ. από Ντοπ. WT ASYN από το Πρωτεάσωμα	ProtFree9merDopWT	ProtDopModWTasyn9 -> Proteasome	$k_{DopMod9merProtFree}$

4.1.3 Μαθηματικός Ορισμός και Εκπαίδευση του Μοντέλου

Όπως περιγράφηκε και στο Κεφάλαιο 2, το επόμενο βήμα μετά τη δημιουργία της δομής του μοντέλου αποτελεί ο ορισμός των βιοχημικών νόμων που θα περιγράφουν τις αντιδράσεις και η απόδοση τιμών στις παραμέτρους αυτών. Στις ακόλουθες ενότητες περιγράφονται οι σχετικές με αυτή τη διαδικασία επιλογές και οι πηγές γνώσεις και τα βήματα που ακολουθήθηκαν ώστε να εκτιμηθούν οι παράμετροι από τα διαθέσιμα δεδομένα των οποίων η μορφή και οι μέθοδοι επεξεργασίας, περιγράφονται και αυτές σε σχετική ενότητα.

4.1.3.1 Ορισμός Βιοχημικών Νόμων και Ομάδων Παραμέτρων

Έχοντας ως στόχο την προσομοίωση του μοντέλου μέσω αλγορίθμων στοχαστικής προσομοίωσης, επιλέχθηκε οι κινητικοί νόμοι όλων των αντιδράσεων να οριστούν ως Mass Action κινητικοί νόμοι. Η επιλογή της στοχαστικής προσομοίωσης σχετίζεται με

την ανάγκη συμπερίληψης της πιθανής αβεβαιότητας στα παρατηρούμενα φαινόμενα αλλά και στο ότι, όπως θα περιγραφεί και σε επόμενη ενότητα, τα διαθέσιμα δεδομένα προέρχονται από περισσότερα του ενός κύτταρα. Επειδή, μία στοχαστική προσομοίωση εμφανίζει εξ' ορισμού περισσότερες πιθανότητες να προσομοιώσει/προβλέψει και τις ακραίες συμπεριφορές του συστήματος, σε σχέση με τη μέση συμπεριφορά, η επιλογή της κρίθηκε αναγκαία.

Δεδομένου λοιπόν ότι κινητικοί νόμοι ορίζονται ως Mass Action, αυτοί αλλά και οι αντίστοιχες διαφορικές εξισώσεις που περιγράφουν το σύστημα έχουν την μορφή που περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2 για τον Mass Action νόμο.

Έχοντας ως στόχο, τώρα, την απλούστευση του μοντέλου όσον αφορά τον αριθμό των διαφορετικών παραμέτρων αντιδράσεων, τουλάχιστον για αυτή την πρώτη φάση ανάπτυξης, , επιλέχθηκε να γίνουν κάποιες ομαδοποιήσεις αντιδράσεων οι οποίες θα έχουν την ίδια τιμή παραμέτρου. Η ομαδοποίηση αυτή κρίθηκε αναγκαία έτσι ώστε να διευκολυνθεί και να πραγματοποιηθεί πιο αποδοτικά η διαδικασία εκπαίδευσης του μοντέλου. Ακολουθώντας παρουσιάζονται αυτές οι ομαδοποιήσεις αλλά και οι λόγοι που επιλέχθηκαν αυτές. Επίσης επισημαίνονται οι αντιδράσεις οι οποίες εξαιρέθηκαν από αυτή τη διαδικασία λόγω του διακριτού ρόλου που έχουν στην συμπεριφορά του συστήματος. Η παρουσίαση γίνεται ξεχωριστά για κάθε ένα από τμήματα του μοντέλου:

- Στο τμήμα της παραγωγής και της τροποποίησης της ASYN δεν έχει γίνει κάποια ομαδοποίηση.
- Στο τμήμα του ολιγομερισμού της ASYN, η βασικότερη ομαδοποίηση που έχει γίνει αφορά στο ότι οι σχετικοί με τον ολιγομερισμό ρυθμοί θεωρούνται ότι είναι κοινοί και για την περίπτωση της τροποποιημένης ASYN και για την περίπτωση της μη τροποποιημένης, εκτός βέβαια των ρυθμών που αφορούν τις οντότητες υψηλού μοριακού βάρους που δεν εμπλέκονται στην πρώτη περίπτωση. Επίσης, όπως ακολουθείται και στην [111], ο ρυθμός σχηματισμού διμερούς είναι διαφορετικός από τον ρυθμό σχηματισμού οποιουδήποτε άλλου ολιγομερούς ο οποίος είναι κοινός για τον σχηματισμό όλων των ολιγομερών από 3-μερές μέχρι και το 9-μερές. Επίσης, το ίδιο ισχύει και για τον ρυθμό της διάσπασης των ολιγομερών. Οι ομαδοποιήσεις που αφορούν το συγκεκριμένο τμήμα δίνονται συνολικά στον ακόλουθο πίνακα:

Πίνακας 4.6: Πίνακας Ομαδοποίησης Παραμέτρων για το τμήμα Ολιγομερισμού

Αρχική Παράμετρος	Παράμετρος Ομαδοποίησης
$k_{WTasyn3merForm}$ $k_{DopModWTasyn2merForm}$	$k_{2merForm}$
$k_{WTasyn3merForm}$ $k_{WTasyn4merForm}$ $k_{WTasyn5merForm}$ $k_{WTasyn6merForm}$	$k_{OligomerForm}$

$k_{WTasyn7merForm}$ $k_{WTasyn8merForm}$ $k_{WTasyn9merForm}$ $k_{DopModWTasyn3merForm}$ $k_{DopModWTasyn4merForm}$ $k_{DopModWTasyn5merForm}$ $k_{DopModWTasyn6merForm}$ $k_{DopModWTasyn7merForm}$ $k_{DopModWTasyn8merForm}$ $k_{DopModWTasyn9merForm}$	
$k_{WTasyn2merDis}$ $k_{WTasyn3merDis}$ $k_{WTasyn4merDis}$ $k_{WTasyn5merDis}$ $k_{WTasyn6merDis}$ $k_{WTasyn7merDis}$ $k_{WTasyn8merDis}$ $k_{WTasyn9merDis}$ $k_{DopModWTasyn2merDis}$ $k_{DopModWTasyn2merDis}$ $k_{DopModWTasyn2merDis}$ $k_{DopModWTasyn2merDis}$ $k_{DopModWTasyn2merDis}$ $k_{DopModWTasyn2merDis}$ $k_{DopModWTasyn2merDis}$ $k_{DopModWTasyn2merDis}$	$k_{DisRate}$

- Στο μέρος του μοντέλου που αφορά το CMA, η κύρια ομαδοποίηση αφορά στο ρυθμό με τον οποίο δεσμεύονται από τον Lamp2a οι διάφορες οντότητες ολιγομερών της μη τροποποιημένης WT ASYN ο οποίος ορίστηκε κοινός (από 3μερές μέχρι και 9μερές). Ακόμα, ο ρυθμός πρόσδεσης των μονομερών και διμερών οντοτήτων της WT ASYN ορίστηκε και αυτός κοινός. Επίσης κοινός ορίστηκε και ο ρυθμός αποδέσμευσης των ολιγομερών ασχέτως της τάξης τους. Για τους ρυθμούς του ολιγομερισμού ισχύει και ότι για τον ολιγομερισμό στο κυτταρόπλασμα. Τέλος θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο ρυθμός που δεσμεύεται η τροποποιημένη ASYN είναι διαφορετικός από αυτόν για την μη τροποποιημένη.

Πίνακας 4.7: Πίνακας Ομαδοποίησης Παραμέτρων για το τμήμα της αποδόμησης από και της καταπίεσης του CMA

Αρχική Παράμετρος	Παράμετρος Ομαδοποίησης
$k_{WTasynrLampBind}$ $k_{WTasynr2merLampBind}$	$k_{WTasyn1_2merBindOnLamp}$
$k_{WTasynr3merLampBind}$ $k_{WTasynr4merLampBind}$ $k_{WTasynr5merLampBind}$ $k_{WTasynr6merLampBind}$ $k_{WTasynr7merLampBind}$ $k_{WTasynr8merLampBind}$ $k_{WTasynr9merLampBind}$	$k_{WTOligoBindOnLamp}$
$k_{WTasyn3merLampFree}$ $k_{WTasyn4merLampFree}$ $k_{WTasyn5merLampFree}$ $k_{WTasyn6merLampFree}$ $k_{WTasyn7merLampFree}$ $k_{WTasyn8merLampFree}$ $k_{WTasyn9merLampFree}$	$k_{LampFreeWTasyn}$

- Για το τμήμα της αποδόμησης από την μακροαυτοφαγία, ο ρυθμός που εισέρχονται οι διάφορες οντότητες στο σχετικό διαμέρισμα θεωρήθηκε κοινός μιας και δεν υπήρχαν ενδείξεις αλλά ούτε και σχετικά δεδομένα που να δείχνουν διαφοροποίηση σε αυτόν. Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε, υπήρχε γνώση σχετικά με το ποιες οντότητες αποδομούνται από τον συγκεκριμένο μηχανισμό.

Πίνακας 4.8: Πίνακας Ομαδοποίησης Παραμέτρων για το τμήμα αποδόμησης από την μακροαυτοφαγία

Αρχική Παράμετρος	Παράμετρος Ομαδοποίησης
$k_{WTasynAutophUptk}$ $k_{WTasyn2merAutophUptk}$ $k_{WTasyn3merAutophUptk}$ $k_{WTasyn4merAutophUptk}$ $k_{WTasyn5merAutophUptk}$ $k_{WTasyn6merAutophUptk}$ $k_{WTasyn7merAutophUptk}$ $k_{WTasyn8merAutophUptk}$ $k_{DopModAutophUptk}$	$k_{OligAutophagUptake}$

$k_{DopMod2merAutophUptk}$	
$k_{DopMod3merAutophUptk}$	
$k_{DopMod4merAutophUptk}$	
$k_{DopMod5merAutophUptk}$	
$k_{DopMod6merAutophUptk}$	
$k_{DopMod7merAutophUptk}$	
$k_{DopMod8merAutophUptk}$	

- Τέλος, για το τμήμα του πρωτεασώματος, ίσχυσαν ακριβώς τα ίδια με τα όσα αναφέρθηκαν για το τμήμα της μακροαυτοφαγίας, δεδομένου ότι και για αυτό το μηχανισμό είχαμε σχετική γνώση με το ποιες οντότητες εμπλέκονται.

Πίνακας 4.9: Πίνακας Ομαδοποίησης Παραμέτρων για το τμήμα του Πρωτεασώματος

Αρχική Παράμετρος	Παράμετρος Ομαδοποίησης
$k_{WTasyn3merProtBind}$ $k_{WTasyn4merProtBind}$ $k_{WTasyn5merProtBind}$ $k_{WTasyn6merProtBind}$ $k_{WTasyn7merProtBind}$ $k_{WTasyn8merProtBind}$ $k_{WTasyn9merProtBind}$ $k_{DopMod3merProtBind}$ $k_{DopMod4merProtBind}$ $k_{DopMod5merProtBind}$ $k_{DopMod6merProtBind}$ $k_{DopMod7merProtBind}$ $k_{DopMod8merProtBind}$ $k_{DopMod9merProtBind}$ $k_{WTasynHighProtBind}$	$k_{ProteasomeBind}$
$k_{WTasyn3merProtFree}$ $k_{WTasyn4merProtFree}$ $k_{WTasyn5merProtFree}$ $k_{WTasyn6merProtFree}$ $k_{WTasyn7merProtFree}$ $k_{WTasyn8merProtFree}$ $k_{WTasyn9merProtFree}$ $k_{DopMod3merProtFree}$	$k_{ProtOligDegr}$

$k_{DopMod4merProtFree}$	
$k_{DopMod5merProtFree}$	
$k_{DopMod6merProtFree}$	
$k_{DopMod7merProtFree}$	
$k_{DopMod8merProtFree}$	
$k_{DopMod9merProtFree}$	

4.1.3.2 Πηγές Τιμών Παραμέτρων

Όπως περιγράφηκε και σε προηγούμενα κεφάλαια, μία συνήθης πρακτική κατά την δημιουργία μοντέλων Συστημικής Βιολογίας, είναι η αναζήτηση των τιμών των παραμέτρων είτε στην βιβλιογραφία και σε σχετικές βάσεις δεδομένων, είτε σε υπάρχοντα συγγενικά μοντέλα. Αυτές οι τιμές μπορεί να χρησιμοποιηθούν απaráλλακτες, είτε μπορούν να αποτελέσουν βάση για την περαιτέρω και λεπτομερέστερη εκπαίδευση του μοντέλου, μειώνοντας έτσι και τις απαιτήσεις σε υπολογιστικό χρόνο.

Για την περίπτωση του μοντέλου που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσης εργασίας, δυστυχώς η πρόσβαση σε σχετική γνώση ήταν περιορισμένη λόγω και του εξειδικευμένου χαρακτήρα του προβλήματος. Ωστόσο η ύπαρξη του μοντέλου που παρουσιάζεται στην [111] ήταν καταλυτική για την εξαγωγή κάποιων πρώτων τιμών για τις παραμέτρους, μιας και παρουσιάζονται αρκετές κοινές ή παρόμοιες αντιδράσεις μεταξύ των δύο μοντέλων. Στη συνέχεια αναφέρονται οι παράμετροι για τις οποίες λήφθηκαν τιμές από την συγκεκριμένη εργασία, ενώ για τις παραμέτρους που υπήρχε πληροφόρηση από άλλες πηγές, αυτό αναφέρεται ειδικά κατά περίπτωση:

Η παραγωγή της WTasyn έλαβε ως τιμή παραμέτρου αυτή που ορίζεται και στην ανωτέρω αναφερόμενη εργασία. Η παράμετρος για την παραγωγή της Ντοπαμίνης ορίστηκε ίση με τον ρυθμό παραγωγής των Ενεργών Οντοτήτων Οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS), ενώ και η τροποποίηση της WTasyn από την Dopamine ορίστηκε να έχει το ρυθμό που οι ROS προκαλούν αλλοιώσεις σε αυτή στο αναφερόμενο μοντέλο.

Για τον ολιγομερισμό της ASYN λήφθηκαν για όλες τις ομάδες παραμέτρων οι τιμές από το αναφερόμενο μοντέλο.

Για το τμήμα του μοντέλου που αφορά το CMA, ο ρυθμός δέσμησης των οντοτήτων της μη τροποποιημένης, από Ντοπαμίνη, ASYN από τον Lamp2a ορίστηκε ίσος με τις τιμές του αναφερόμενου μοντέλου. Το ίδιο ακριβώς ίσχυσε και για τους ρυθμούς εσωτερίκευσης και αποδέσμησης. Ωστόσο, για τους αντίστοιχους ρυθμούς που αφορούσαν την τροποποιημένη μορφή της ASYN, υπήρξε μία προσαύξηση των ρυθμών δέσμησης κατά 20%

Για τις σχετικές με την μακροαυτοφαγία αντιδράσεις, ο ρυθμός εισόδου των οντοτήτων στο σχετικό με την μακροαυτοφαγία διαμέρισμα ορίστηκε ίσος με το ρυθμό δέσμησης αυτών από τον Lamp2a. Η συγκεκριμένη επιλογή, δεδομένης της απουσίας σχετικών

λεπτομερών δεδομένων, έγινε έτσι ώστε ο σχετικός ρυθμός να τεθεί σε ρεαλιστικά επίπεδα ενός πρωτεολυτικού μηχανισμού. Ωστόσο, όπως θα παρουσιαστεί και στη συνέχεια, ο συγκεκριμένος ρυθμός εκτιμήθηκε και μέσω ημι-ποσοτικοποιημένων δεδομένων και έτσι η τιμή που δόθηκε στην συγκεκριμένη φάση αποτελούσε μία πρώτη προσέγγιση.

Τέλος για τις αντιδράσεις που σχετίζονται με το πρωτεάσωμα, ο ρυθμός δημιουργίας συμπλόκων όλων των οντοτήτων με το πρωτεάσωμα, τέθηκε ίσος με τον ρυθμό δέσμευσης από τον Lamp2a ακριβώς για τους ίδιους λόγους με πριν. Ωστόσο ο συγκεκριμένος ρυθμός εκτιμήθηκε υπολογιστικά, όπως θα παρουσιαστεί στην αντίστοιχη ενότητα, χρησιμοποιώντας και σε αυτή την περίπτωση ημι-ποσοτικοποιημένη αλλά και ποιοτική γνώση.

4.1.3.3 Πηγές και τύποι Δεδομένων

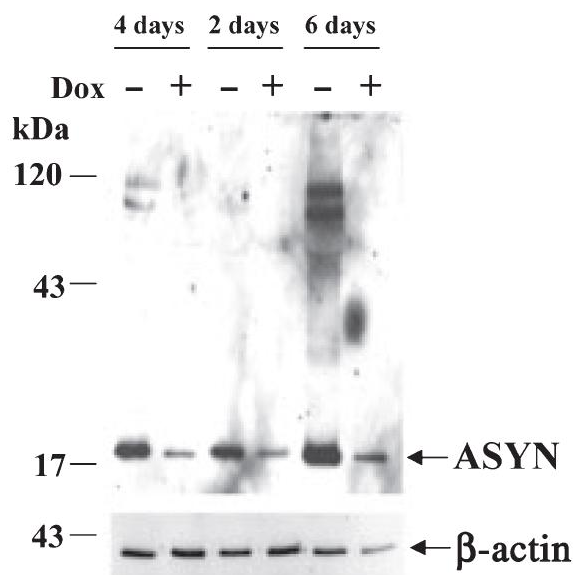
Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση του μοντέλου, προήλθαν αποκλειστικά από πειράματα που διενεργήθηκαν στο εργαστήριο του τμήματος Βασικής Νευροβιολογίας του ΙΙΒΕΑΑ. Το εργαστηριακό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στα συγκεκριμένα πειράματα ήταν ακριβώς το ίδιο με αυτό των εργασιών ([86, 87, 88]), όσον αφορά την υπερ-έκφραση της WT ASYN σε SH-SY5Y κυτταρική σειρά. Το ότι ακολουθήθηκε το ίδιο εργαστηριακό πρωτόκολλο αλλά και η εμφανιζόμενη υψηλή επαναληψιμότητα των σχετικών πειραμάτων (όπως ελέγχεται από διάφορες διαδικασίες ελέγχου που περιγράφονται στις σχετικές εργασίες) επέτρεψε την αξιοποίηση εργαστηριακών ευρημάτων τα οποία προέκυψαν από πειράματα που διενεργήθηκαν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Ωστόσο, τα ποσοτικά δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν, προέρχονται από ένα σύνολο πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν την ίδια περίοδο, διασφαλίζοντας έτσι τη συμβατότητα των μετρήσεων μεταξύ τους.

Οι κατηγορίες των δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν (πέραν της ποιοτικής γνώσης που χρησιμοποιήθηκε στην δημιουργία της δομής του μοντέλου) ήταν δύο. Πρώτη κατηγορία αποτέλεσαν τα ημι-ποσοτικοποιημένα δεδομένα τα οποία αφορούν σε μετρήσεις για διάφορες μοριακές οντότητες του συστήματος οι οποίες δεν υπολογίστηκαν σε επίπεδο συγκέντρωσης ή αριθμού μορίων αλλά σε σχετικά επίπεδα σε σχέση με άλλες οντότητες του συστήματος ή σε σχέση με τα επίπεδα της ίδιας οντότητας σε διαφορετικές συνθήκες διενέργειας του πειράματος. Στη δεύτερη κατηγορία εντάσσονται τα ποσοτικοποιημένα δεδομένα τα οποία είχαν την μορφή συγκεντρώσεων ή αριθμού μορίων και προέκυψαν από τα ειδικά πειράματα που διενεργήθηκαν για την ανάπτυξη της παρούσας εργασίας.

Όσον αφορά την πρώτη κατηγορία, χρησιμοποιήθηκαν πληροφορίες σχετικές με τη συμμετοχή της μακροαυτοφαγίας στην αποδόμηση της ASYN. Για την περίπτωση αυτή, ο στόχος που τέθηκε ήταν να χρησιμοποιηθούν κάποια δεδομένα ώστε να προκύψει ο ρυθμός με τον οποίο αποδομείται η ASYN (σε πρώτη φάση η μονομερής) αποκλειστικά από αυτόν τον πρωτεολυτικό μηχανισμό. Δεδομένου ότι, όπως παρουσιάστηκε σε προηγούμενες ενότητες, γνωρίζουμε πως η μονομερής ASYN αποδομείται από το CMA και την μακροαυτοφαγία, ενώ δεν υπάρχουν ενδείξεις για αποδόμηση της από το

Πρωτεάσωμα (όπως αναφέρθηκε, τουλάχιστον στα κυτταρικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο), χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που συγκρίνουν το ρυθμό αποδόμησης της WT ASYN και της ΔDQ/WT ASYN. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάστηκαν στο Σχήμα 3.2. Δεδομένων των παραπάνω, η υπόθεση που έγινε είναι ότι η αποδόμηση που παρατηρείται για την μονομερή ΔDQ/WT ASYN, η οποία και μετράται, οφείλεται αποκλειστικά στην μακροαυτοφαγία. Τα δεδομένα αυτά ήταν διαθέσιμα σε ημι-ποσοτικοποιημένη μορφή και πιο συγκεκριμένα, δίδονται ως ποσοστό της μη αποδομημένης ΔDQ/WT ASYN στις αντίστοιχες ώρες, σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα της (την στιγμή που ξεκίνησε η προσθήκη dox-υπενθυμίζεται ότι το πείραμα αφορά σε παύση της υπερ-έκφρασης την 5^η ημέρα μέσω της προσθήκης dox και μέτρησης της αποδόμησης της ASYN). Για την αξιοποίηση των συγκεκριμένων δεδομένων, χρησιμοποιήθηκε ένα υπο-μοντέλο το οποίο παρουσιάζεται σε επόμενη ενότητα, μαζί με την διαδικασία εκπαίδευσης του για τον υπολογισμό του ρυθμού αποδόμησης του μονομερούς της ASYN από την μακροαυτοφαγία.

Στην δεύτερη κατηγορία δεδομένων, τώρα, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα από ανάλυση μέσω της μεθόδου Ανοσοαποτυπώματος (Immunoblot-Western Blot [112]), υλικού από κύτταρα SH-SY5Y που υπερ-έκφραζαν την WT ASYN και για τα οποία ακολουθήθηκε το σχετικό πρωτόκολλο [87]. Οι σχετικές μετρήσεις αφορούσαν στα επίπεδα της μονομερούς, της διμερούς και των ολιγομερών της ASYN. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι συγκεκριμένες μετρήσεις αντιπροσώπευαν το άθροισμα της μη τροποποιημένης και της τροποποιημένης από Ντοπαμίνη ASYN, μιας και δεν υπάρχει η δυνατότητα μέσω της συγκεκριμένης τεχνικής να διαχωριστούν αυτές οι δύο μορφές. Ένα παράδειγμα αποτελέσματος πειράματος Western Blot από σχετικά πειράματα υπερ-έκφρασης της WT ASYN σε SH-SY5Y κύτταρα, δίνεται στην ακόλουθη εικόνα.



Εικόνα 4.7 Παράδειγμα αποτελέσματος Western Blot Analysis σε SH-SY5Y κύτταρα κατά την υπερ-έκφραση της WT ASYN και παρατήρηση ολιγομερών

Πιο συγκεκριμένα, ξεκινώντας από την ημέρα στην οποία προστέθηκε RA στην καλλιέργεια (για την διαφοροποίηση των κυττάρων σε νευρώνες) και για τις επόμενες 7 ημέρες, ανά κάθε ημέρα λήφθηκε το υλικό από $3 \cdot 10^5$ κύτταρα (ο ακριβής αριθμός

διασφαλίζεται μέσω της χρήσης κυτταρομετρίας ροής-flow cytometry [113]) και έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία, αυτό αναλύθηκε μέσω Western Blot, χρησιμοποιώντας κατάλληλο αντίσωμα για την ASYN. Το υλικό αυτό αντιστοιχούσε σε κάθε περίπτωση σε 30μg συνολική πρωτεΐνης (όχι μόνο ASYN). Ως αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας, για κάθε ημέρα δημιουργούταν στη διάταξη του τζέλ, μία διακριτή μπάντα στα 17kDa που αντιστοιχεί στην μονομερή ASYN, μία διακριτή μπάντα στα 35kDa περίπου που αντιστοιχεί στην διμερή μορφή της ASYN και μία διάχυτη μπάντα μεταξύ των 50kDa και των 130kDa περίπου (όπως αυτή που εμφανίζεται στην ανωτέρω εικόνα). Για την συγκεκριμένη μπάντα αποφασίστηκε να γίνει η υπόθεση ότι αντιστοιχεί στα ολιγομερή της ASYN από το 3-μερές μέχρι και το 9-μερές.

Ταυτόχρονα με τα όσα αναφέρονται παραπάνω, στην ίδια διάταξη εισήχθησαν 3 διαφορετικές γνωστές ποσότητες ανασυνδυασμένης(recombinant) μονομερούς ASYN με στόχο την δυνατότητα σύγκρισής με την λαμβανόμενη από τα κύτταρα ASYN. Οι ποσότητες αυτές ήταν 3,5ng, 7ng και 14ng.

Ακολούθως και κατόπιν κατάλληλης μεταφοράς του τζελ σε φιλμ/εικόνα με τρόπο που περιγράφεται στην [112], αυτή ψηφιοποιήθηκε για την περαιτέρω ανάλυση και επεξεργασία της. Στη συνέχεια μέσω κατάλληλου λογισμικού μετρήθηκε η απόλυτη ένταση κάθε μίας από τις παραπάνω αναφερόμενες μπάντες (μονομερές, διμερές και ολιγομερή για κάθε ημέρα και τρεις ανασυνδυασμένες).

Γνωρίζοντας τώρα τις εντάσεις κάθε μπάντας είναι εφικτός ο υπολογισμός της ποσότητας των οντοτήτων της ASYN που λήφθηκε από τα κύτταρα, αρχικά σε ng και κατόπιν σε αριθμό μορίων (αναγκαίος για την στοχαστική προσομοίωση), συγκρίνοντας τις σχετικές εντάσεις με αυτές της ανασυνδυασμένης ASYN.

Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την μονομερή ASYN ήταν η ακόλουθη:

$$\text{μονομ. WT ASYN}(ng) = \frac{\left(\frac{\text{ανασυν. ASYN1} * \text{έντ. μονομ.}(ng)}{\text{έντ. ανασυν. ASYN1}} + \frac{\text{ανασυν. ASYN2} * \text{έντ. μονομ.}(ng)}{\text{έντ. ανασυν. ASYN2}} + \frac{\text{ανασυν. ASYN3} * \text{έντ. μονομ.}(ng)}{\text{έντ. ανασυν. ASYN3}} \right)}{3}$$

Εξίσωση 4.1

$$\text{μονομ. WT ASYN / κύτταρο}(ng) = \frac{\text{μονομ. WT ASYN}(ng)}{3 \cdot 10^5}$$

Εξίσωση 4.2

$$\text{μονομ. WT ASYN / κύτταρο}(\text{αριθμ. μορ.}) = \frac{\text{μονομ. WT ASYN / κύτταρο}(ng)}{\text{μοριακό βάρος μονομ. WT ASYN}(ng)}$$

Εξίσωση 4.3

Στην παραπάνω διαδικασία, για την μετατροπή των 14.4 kDa (μοριακό βάρος της ASYN) σε ng χρησιμοποιήθηκε η αναλογία που δίνεται στην [114].

Θα πρέπει να σημειωθεί ιδιαίτερα ότι για να καταστεί εφικτή η Στοχαστική Προσομοίωση αλλά και για να μειωθεί το σχετικό υπολογιστικό στόχος, επιλέχθηκε ο προκύπτων αριθμός μορίων να κλιμακωθεί διαιρώντας τον δια του 1000. Η συγκεκριμένη πρακτική ακολουθείται και στην [111] για παρόμοιους λόγους. Επιπροσθέτως, η κλιμάκωση των δεδομένων οδηγεί τους αριθμούς μορίων σε επίπεδα παρόμοια με αυτά της προαναφερθείσας εργασίας, επιτρέποντας την άμεση σύγκριση αλλά και την άμεση αξιοποίηση διαφόρων ευρημάτων αυτής.

Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία για τον υπολογισμό του αριθμού μορίων της διμερούς ASYN. Ωστόσο, για την συγκεκριμένη περίπτωση, επιλέχθηκε ως ένταση αναφοράς να ληφθεί αυτή της μονομερούς ASYN, έχοντας πλέον μετρήσεις σε επίπεδο ηg και αριθμού μορίων. Ακολουθώντας δίνονται τα βήματα της διαδικασίας.

$$\text{διμερούς WT ASYN}(ng) = \frac{\text{μονομ. WT ASYN} \cdot \text{έντ. διμερούς}(ng)}{\text{έντ. μονομ.}}$$

Εξίσωση 4.4

$$\text{διμερούς WT ASYN/κύτταρο(αριθμ.μορ.)} = \frac{\frac{\text{διμερούς WT ASYN}(ng)}{3 \cdot 10^5}}{2 \cdot (\text{μοριακό βάρος μονομ. WT ASYN}(ng))}$$

Εξίσωση 4.5

Δεδομένου, τώρα, ότι για την περίπτωση των ολιγομερών δεν ήταν εφικτή η διακριτή μέτρηση της αντίστοιχης έντασης για κάθε ολιγομερές, αλλά μόνο αυτής της διάχυτης μπάντας, η παραπάνω διαδικασία δεν ήταν δυνατό να εφαρμοστεί. Για να υπάρξει μία μέτρηση του συνόλου του υλικού που βρίσκεται σε ολιγομερισμένη μορφή, επιλέχθηκε η σύγκριση της έντασης της διμερούς ASYN με αυτή της διάχυτης μπάντας (για την οποία όπως προαναφέρθηκε έχει γίνει η υπόθεση ότι περιέχει τα ολιγομερή μεταξύ του 3-μερούς και του 9-μερούς) ώστε να υπάρξει μία προσέγγιση του αθροίσματος των ολιγομερών σε επίπεδο αριθμού μορίων. Για τον υπολογισμό αυτού του αριθμού, κανονικοποιήθηκαν οι εντάσεις της διμερούς και των ολιγομερών με τις εντάσεις των ανασυνδυασμένων ASYN και κατόπιν υπολογίστηκε ο λόγος μεταξύ των επιπέδων της διμερούς και των ολιγομερών και κατόπιν πολλαπλασιάζοντας αυτόν τον λόγο με τα επίπεδα της διμερούς προέκυψαν τα επίπεδα του αθροίσματος των ολιγομερών. Τα βήματα της διαδικασίας περιγράφονται με λεπτομέρεια ακολούθως:

1. Υπολογισμός του λόγου έντασης της διμερούς (σχετική ένταση διμερούς) σε σχέση με αυτόν των ανασυνδυασμένων ASYN (ξεχωριστά για κάθε μία).
2. Υπολογισμός του λόγου έντασης της διάχυτης μπάντας των ολιγομερών (σχετική ένταση ολιγομερών) σε σχέση με αυτόν των ανασυνδυασμένων ASYN (ξεχωριστά για κάθε μία).
3. Υπολογισμός του λόγου σχετικής έντασης ολιγομερών δια την σχετική ένταση της διμερούς για κάθε περίπτωση ανασυνδυασμένης ASYN.
4. Υπολογισμός του μέσου όρου των παραπάνω λόγων (σχετικά επίπεδα αθροίσματος ολιγομερών σε σχέση με τη διμερή)
5. Υπολογισμός των επιπέδων του αθροίσματος των ολιγομερών ανά ημέρα πολλαπλασιάζοντας τα σχετικά επίπεδα αθροίσματος ολιγομερών σε σχέση με τη διμερή με τα επίπεδα της διμερούς για την ίδια ημέρα.

Χρησιμοποιώντας τις μεθοδολογίες που περιγράφηκαν παραπάνω, υπολογίστηκαν οι αριθμοί μορίων για κάθε μία από τις παρατηρούμενες οντότητες, ανά ημέρα καλλιέργειας. Τα επίπεδα αυτά δίνονται στον ακόλουθο πίνακα.

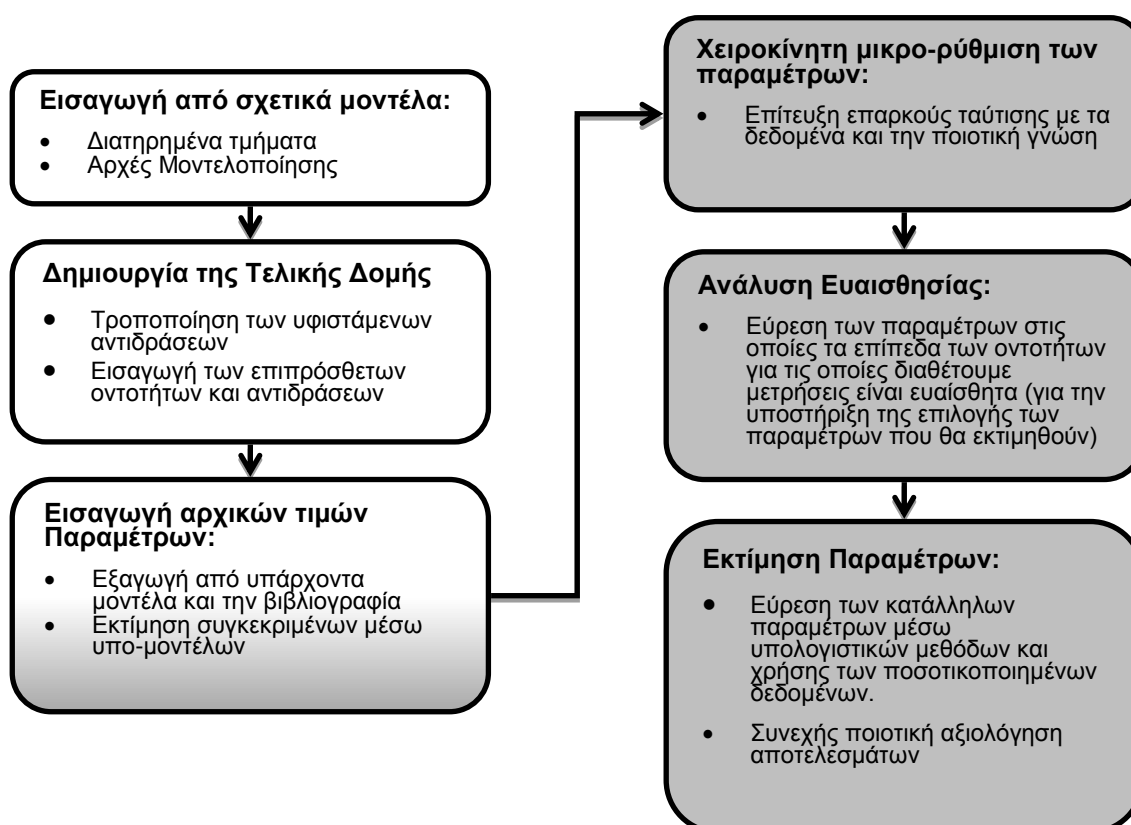
Πίνακας 4.10 Πίνακας των ποσοτικοποιήσεων των διαθέσιμων δεδομένων

Ημέρα	Αριθμός Μορίων Μονομερούς WT ASYN	Αριθμός Μορίων Διμερούς WT ASYN	Άθροισμα Αριθμού Μορίων Ολιγομερών WT ASYN
1 ^η	2605	22	108
2 ^η	2106	18	139
3 ^η	1697	22	154
4 ^η	1277	33	140
5 ^η	1030	37	151
6 ^η	1318	54	153
7 ^η	1205	86	197

Με βάση τα επίπεδα αυτά, πραγματοποιήθηκε η εκπαίδευση παραμέτρων όπως περιγράφεται στην επόμενη ενότητα.

4.1.3.4 Διαδικασία Εκπαίδευσης του Μοντέλου

Όπως παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο 2, το τελευταίο κύριο στάδιο στην ανάπτυξη ενός μοντέλου Συστημικής Βιολογίας, αποτελεί η εκπαίδευση-ρύθμισή του μέσω των διαθέσιμων εργαστηριακών δεδομένων. Στο ακόλουθο σχήμα παρουσιάζονται τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την εκπαίδευση του μοντέλου όπως και τα βήματα δημιουργίας της δομής και μαθηματικού ορισμού του μοντέλου, όπως περιγράφηκαν στις προηγούμενες ενότητες, για λόγους πληρότητας. Με άσπρο φόντο εμφανίζονται τα βήματα τα οποία έχουν ήδη παρουσιαστεί σε προηγούμενες ενότητες ενώ με γκριζο φόντο, τα βήματα τα οποία θα παρουσιαστούν στις επόμενες ενότητες.



Σχήμα 4.1 Τα βήματα δημιουργίας του μοντέλου

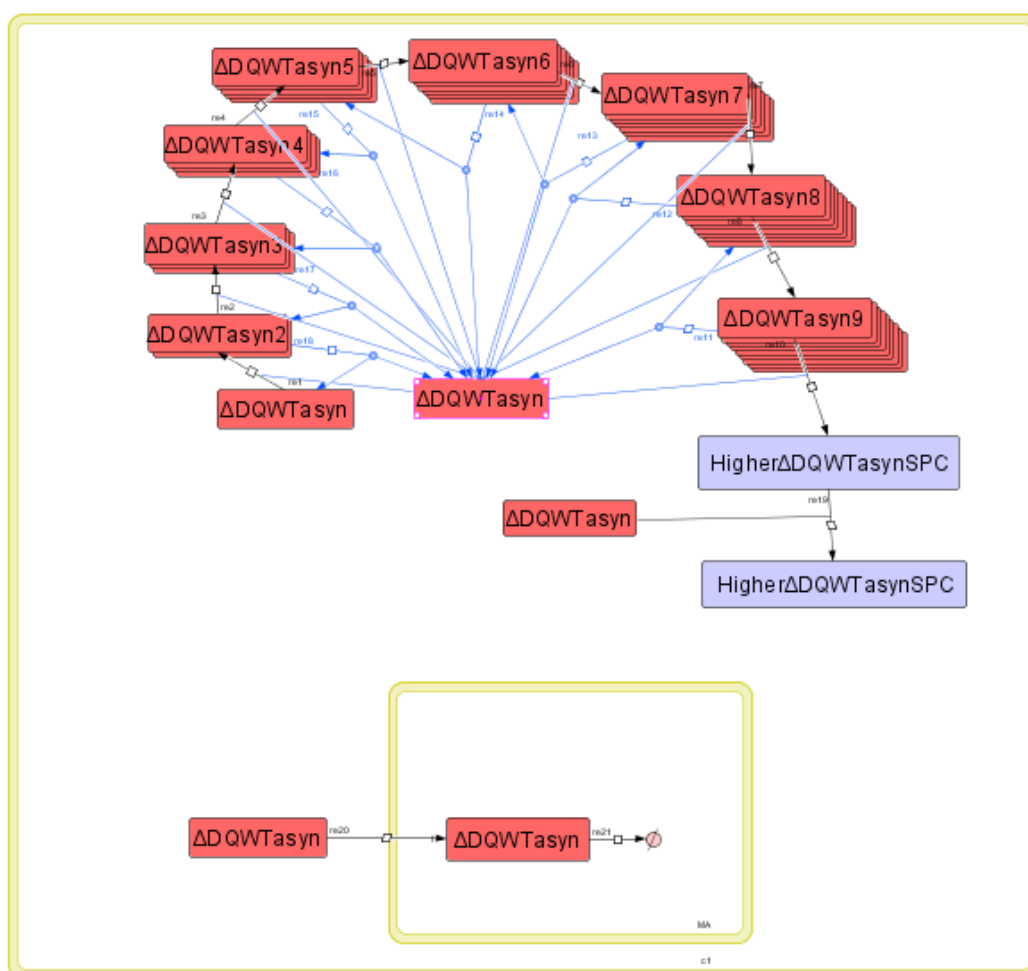
Στις επόμενες ενότητες παρουσιάζονται λεπτομερώς όσα από τα παραπάνω βήματα δεν έχουν συζητηθεί μέχρι το παρόν σημείο της εργασίας.

4.1.3.4.1 Εκτίμηση συγκεκριμένων παραμέτρων μέσω υπό-μοντέλων

Όπως σημειώθηκε στην ενότητα 4.1.3.3, στα πλαίσια των αρχικών βημάτων ρύθμισης και μάθησης των παραμέτρων του μοντέλου, αξιοποιήθηκαν ημι-ποσοτικοποιημένα δεδομένα για τον υπολογισμό παραμέτρων μέσω της χρήσης υπο-μοντέλων. Η παράμετρος που εκτιμήθηκε μέσω της συγκεκριμένης διαδικασίας ήταν ο ρυθμός αποδόμησης της μονομερούς ASYN από την μακροαυτοφαγία (ειδικότερα, ο ρυθμός που εισάγεται αυτή στο διαμέρισμα που αναπαριστά το αυτοφαγόσωμα).

Πιο συγκεκριμένα, διαθέτοντας τα δεδομένα για την αποδόμηση της $\Delta DQ/WT$ ASYN που δόθηκαν στο Σχήμα 3.2, και πραγματοποιώντας την υπόθεση ότι για την αποδόμηση αυτής ευθύνεται μόνο η μακροαυτοφαγία, δημιουργήθηκε ένα υπό-μοντέλο (δηλαδή ένα μοντέλο που περιέχει τμήματα του γενικότερου μοντέλου) με στόχο την εκτίμηση της εν λόγω παραμέτρου μέσω αυτού. Η υπόθεση που περιγράφηκε προηγουμένως, βασίζεται πρώτον στο ότι η $\Delta DQ/WT$ δεν αποδομείται από το CMA και στο ότι όπως δείχθηκε στην [86] το Πρωτεάσωμα δεν συμμετέχει στην αποδόμηση της μονομερούς ASYN ενώ επίσης και στο ότι δεν έχει αποδειχθεί συμμετοχή κάποιου άλλου μηχανισμού στην αποδόμηση της ASYN.

Στο συγκεκριμένο μοντέλο εισήχθησαν όλες εκείνες οι αντιδράσεις οι οποίες θεωρήθηκαν ότι μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα της μονομερούς $\Delta DQ/WT$ ASYN για τα οποία υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα. Στην ακόλουθη εικόνα, δίνεται το εν λόγω υπο-μοντέλο.



Εικόνα 4.8 Υπομοντέλο. Ολιγομερισμός και αποδόμηση της $\Delta DQ/WT$ ASYN (σε SBGN)

Όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα, το μοντέλο αποτελείται από δύο βασικά τμήματα. Το ένα τμήμα αφορά στον ολιγομερισμό της $\Delta DQ/WT$ ASYN ενώ το δεύτερο αφορά στην είσοδο της μονομερούς $\Delta DQ/WT$ ASYN στο αυτοφαγόσωμα (ο ρυθμός της οποίας αντίδρασης έπρεπε να εκτιμηθεί).

Όσον αφορά την τροποποίηση της ΔDQ/WT ASYN από Ντοπαμίνη, κρίθηκε ότι η εισαγωγή του συγκεκριμένου φαινομένου δεν θα είχε συγκεκριμένη αξία μιας και δεν υπάρχουν ενδείξεις για διαφορετική συμπεριφορά των τροποποιημένων οντοτήτων όσον αφορά την μακροαυτοφαγία.

Επίσης, όπως είναι εύκολα αντιληπτό μέσω της ανωτέρω εικόνας, δεν υπάρχει κάποια αντίδραση παραγωγής της ΔDQ/WT ASYN. Κάτι τέτοιο οφείλεται στο ότι τα διαθέσιμα δεδομένα αφορούσαν σε πείραμα κατά το οποίο την 5^η ημέρα της καλλιέργειας, πραγματοποιούνταν προσθήκη dox στο σύστημα έτσι ώστε να σταματήσει η έκφραση του γονιδίου της ΔDQ/WT ASYN και από εκείνη τη στιγμή και μετά, μετρήθηκαν τα επίπεδα της μονομερούς ΔDQ/WT ASYN.

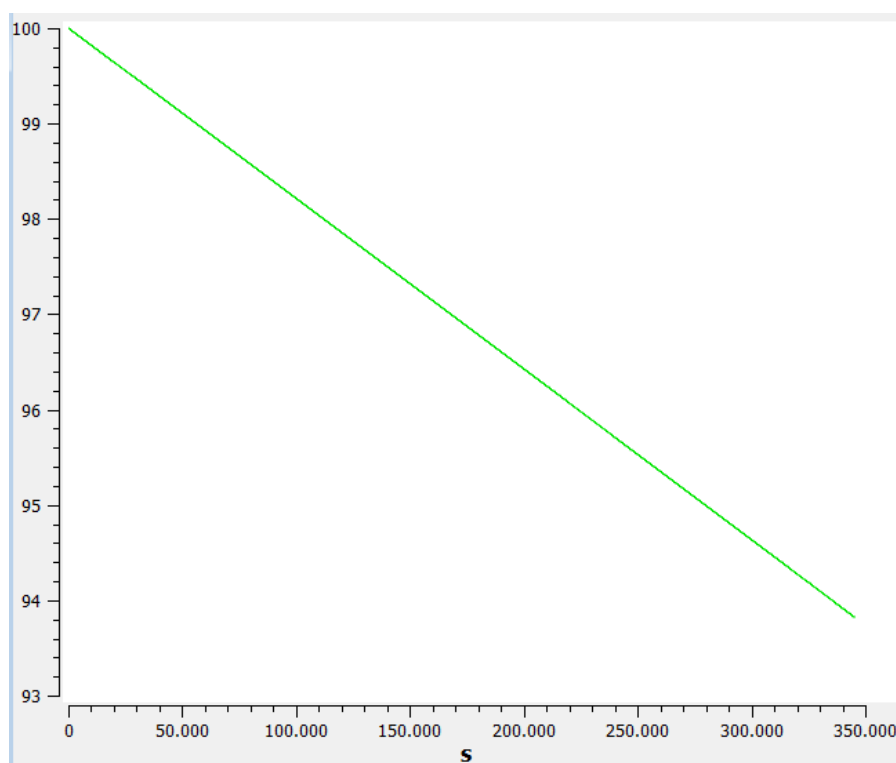
Όσον αφορά τώρα την προσθήκη της διαδικασίας ολιγομερισμού της ΔDQ/WT ASYN, αυτή έγινε έτσι ώστε, δεδομένου ότι μέχρι τη στιγμή της προσθήκης dox υπήρχε υπερ-έκφραση της ΔDQ/WT ASYN και έτσι πιθανώς και ο επακόλουθος ολιγομερισμός, να μην αποδοθεί στην αποδόμηση το ποσοστό της μονομερούς ΔDQ/WT ASYN το οποίο κατέληξε σε ολιγομερή και προφανώς δεν προσμετρήθηκε στα επίπεδα αυτής.

Εισάγοντας τώρα τις τιμές των παραμέτρων από το γενικότερο μοντέλο, όπως έχουν διαμορφωθεί μέχρι στιγμής, στις αντιδράσεις του υπο-μοντέλου, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της (αντίστοιχης) παραμέτρου $k_{WTasynAutophUptk}$ η οποία αναφέρεται και στην παράμετρο ομαδοποίησης $k_{OligAutophagUptake}$ μέσω των ακόλουθως δεδομένων, όπως αυτά υπαγορεύονται από τα ημι-ποσοτικοποιημένα δεδομένα.

Πίνακας 4.11: Πίνακας των ημι-ποσοτικοποιημένων δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπαίδευση του υπο-μοντέλου

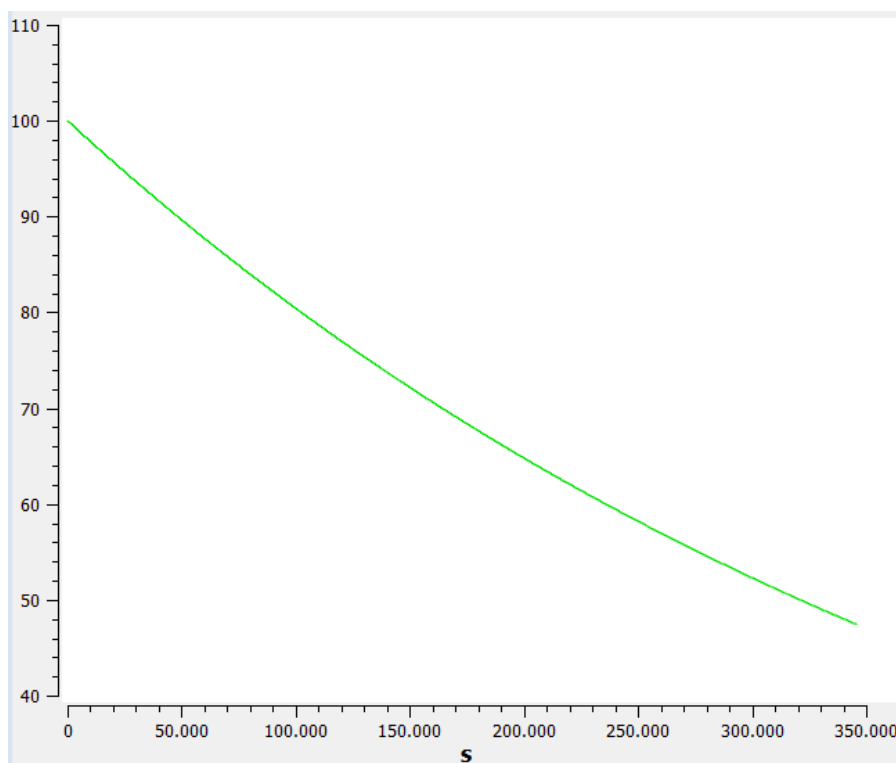
Χρόνος (δευτ.)	Αριθμός Μορίων Μονομερούς ΔDQ/WT ASYN
0	100
28800	98
57600	85
129600	80
345600	45

Βάσει της αρχικής τιμής της παραμέτρου ($4e-08$), όπως αυτή ορίστηκε από τις επιλογές που παρουσιάστηκαν στην Ενότητα 4.1.3.3, η δυναμική συμπεριφορά των επιπέδων της μονομερούς ΔDQ/WT ASYN δίνεται στο ακόλουθο Σχήμα (Ντετερμινιστική Προσομοίωση για 345600 δευτερόλεπτα):



Σχήμα 4.2: Αποτελέσματα προσομοίωσης του υπομοντέλου αποδόμησης της $\Delta DQ/WT$ ASYN από την μακροαυτοφαγία, πριν την εκτίμηση παραμέτρων

Όπως είναι εύκολα αντιληπτό, η προσομοιωμένη συμπεριφορά απέχει σημαντικά από την επιθυμητή. Έτσι, πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ανωτέρω αναφερόμενης παραμέτρου μέσω του αλγορίθμου Particle Swarm. Τα αποτελέσματα προσομοίωσης του υπο-μοντέλου, μετά την εκτίμηση της παραμέτρου, δίνονται στο ακόλουθο Σχήμα.



Σχήμα 4.3: Αποτελέσματα προσομοίωσης του υπομοντέλου αποδόμησης της $\Delta DQ/WT$ ASYN από την μακροαυτοφαγία, μετά την εκτίμηση παραμέτρων

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα κρίνονται ικανοποιητικά για την επιθυμητή προσέγγιση της συμπεριφοράς και σε ποιοτικά αλλά και σε ποσοτικά πλαίσια και έτσι η υπολογισθείσα τιμή ($2.05308e-06$) υιοθετήθηκε για τα επόμενα βήματα ανάπτυξης και εκπαίδευση του μοντέλου. Θα πρέπει ωστόσο να σημειωθεί ότι επειδή τα διαθέσιμα δεδομένα ήταν ημι-ποσοτικά ενώ επίσης η διαδικασία εκτίμησης έγινε σε απομονωμένα από το υπόλοιπο σύστημα πλαίσια, η συγκεκριμένη παράμετρος τέθηκε υπό τροποποίηση και στο στάδιο της Χειροκίνητης μικρο-ρύθμισης αλλά και στην Εκτίμηση Παραμέτρων, των οποίων η περιγραφή ακολουθεί στις επόμενες ενότητες.

4.1.3.4.2 Χειροκίνητη μικρο-ρύθμιση των παραμέτρων

Γνωρίζοντας εκ των προτέρων ότι η διαδικασία εκτίμησης παραμέτρων θα είναι ιδιαίτερα απαιτητική, λόγω της σχετικά περιορισμένης ποσότητας δεδομένων (και όσον αφορά τις στιγμές δειγματοληψίας αλλά και όσον αφορά τον αριθμό των οντοτήτων για τις οποίες υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα), αποφασίστηκε πριν την διαδικασία εκτίμησης παραμέτρων με υπολογιστικές μεθόδους, να γίνει μία χειροκίνητη τροποποίηση των αρχικών τιμών των παραμέτρων. Η συγκεκριμένη διαδικασία είχε ως στόχο την οδήγηση του μοντέλου σε μία συμπεριφορά η οποία θα μοιράζεται κοινά χαρακτηριστικά συμπεριφοράς με το κυτταρικό μοντέλο, έχοντας ως βάση και τα ποσοτικά δεδομένα αλλά και την ποιοτική γνώση για την συμπεριφορά του συστήματος. Η επιλογή των παραμέτρων που τροποποιήθηκαν βασίστηκε αποκλειστικά στην εμπειρία για την επιρροή των παραμέτρων στο σύστημα και στα αποτελέσματα της προσομοίωσης που ακολουθούσε την τροποποίηση.

Για την συγκεκριμένη διαδικασία, επιλέχθηκε η χρήση Ντετερμινιστικού αλγορίθμου προσομοίωσης, λόγω της ιδιότητάς του να επιστρέφει τη μέση συμπεριφορά του συστήματος χωρίς μεταλλαγές μεταξύ των προσομοιώσεων με ίδιες παραμέτρους. Ωστόσο, έπειτα από κάθε ουσιαστικό βήμα τροποποίησης (που οδηγούσε, δηλαδή, σε ομοιότερη συμπεριφορά με την συμπεριφορά στόχο), εκτελέστηκε και ικανός αριθμός στοχαστικών προσομοιώσεων (συνήθως 10) ώστε να διασφαλιστεί ότι και σε αυτά τα πλαίσια η συγκεκριμένη τροποποίηση ήταν ουσιώδης.

Τα κύρια χαρακτηριστικά συμπεριφοράς που τέθηκαν ως στόχοι για την συγκεκριμένη διαδικασία ήταν:

- Οι τάσεις ανόδου ή καθόδου των επιπέδων της μονομερούς ASYN να ακολουθούν τις τάσεις που υποδεικνύουν τα δεδομένα, δηλαδή από τα υψηλά επίπεδα που βρίσκεται την 1^η ημέρα (αμέσως μετά τη διαφοροποίηση), να μειώνεται ραγδαία μέχρι και την 5^η ημέρα και την 6^η μέρα να παρουσιάσει αύξηση.
- Η διμερής ASYN θα πρέπει να παρουσιάζει σταθερά επίπεδα τις τρεις πρώτες μέρες και μετά σταδιακά να αυξάνεται με ιδιαίτερα σημαντική αύξηση την τελευταία ημέρα.
- Τα ολιγομερή (το άθροισμα από 3μερές μέχρι και 9μερές) θα πρέπει να παρουσιάσουν σημαντική αύξηση από την 1^η στην 2^η ημέρα και μέχρι την 6^η

μέρα να έχουν αυξητική τάση, ενώ την 7^η ημέρα θα πρέπει να σημειώνουν ραγδαία αύξηση.

- Δεν θα πρέπει να εμφανίζονται σημαντικά επίπεδα οντοτήτων υψηλότερου μοριακού βάρους από τα 9μερή (βάσει των ευρημάτων που παρουσιάζονται στην [87]).
- Τα επίπεδα του ελεύθερου Lamp2a, θα πρέπει σταδιακά να μειώνονται και να οδηγούμαστε σε υψηλά επίπεδα κορεσμού αυτού (δηλαδή να οδηγούμαστε προς την πλήρη δέσμευση-καταπίεση όλων των Lamp2a) κατά τις τελευταίες μέρες, δεδομένου ότι ο παρατηρούμενος κυτταρικός θάνατος, έχει συσχετιστεί με αυτή την καταπίεση [88]. Ειδικότερα, η πλήρης καταπίεση του CMA θα πρέπει να εμφανίζεται κατά τις τελευταίες μέρες μιας και όπως παρουσιάζεται στην προαναφερόμενη εργασία, η καταπίεση αυτή συσχετίζεται άμεσα με την έναρξη της διαδικασίας του κυτταρικού θανάτου μέσω αυτοφαγίας. Έτσι, η συμπεριφορά του συστήματος δεν θα πρέπει να παρουσιάζει καταπίεση του CMA σε ιδιαίτερα αρχικά στάδια, κάτι που θα υποδείκνυε και παρατήρηση κυτταρικού θανάτου σε ημέρες νωρίτερα από αυτές που παρατηρούνται εργαστηριακά.

Η διαδικασία, όντας χειροκίνητη, δεν πραγματοποιήθηκε μέσω αυστηρών πλαισίων συγκεκριμένης μεθοδολογίας. Σε κάθε βήμα, μέσω της μεθόδου δοκιμής και απόρριψης, τροποποιούνταν μία παράμετρος ώστε να προσεγγιστεί καλύτερα το επιθυμητό αποτέλεσμα. Το ποια παράμετρος τροποποιούνταν καθοριζόταν από την εμπειρική κρίση της επιρροής της παραμέτρου αυτής στο σύστημα αλλά και από την καμπύλη (μονομερή, διμερή, ολιγομερή) που εκείνη τη στιγμή επιχειρούταν να προσαρμοστεί στους στόχους. Ωστόσο ένα γενικό πλαίσιο των βημάτων της μεθοδολογίας που ακολουθήθηκε μπορεί να δοθεί ως ακολούθως:

1. Επίτευξη ικανοποιητικής συμπεριφοράς της καμπύλης της μονομερούς WT ASYN χωρίς την εξέταση των επιπέδων της διμερούς και των ολιγομερών
2. Επίτευξη ικανοποιητικής συμπεριφοράς της καμπύλης της διμερούς WT ASYN με ταυτόχρονη εξέταση της μη τροποποίησης της ικανοποιητικής συμπεριφοράς της μονομερούς
3. Επίτευξη ικανοποιητικής συμπεριφοράς της καμπύλης του αθροίσματος των ολιγομερών της WT ASYN με ταυτόχρονη εξέταση της μη τροποποίησης της ικανοποιητικής συμπεριφοράς της μονομερούς και της διμερούς.

Στην παραπάνω διαδικασία, σε κάθε βήμα εξεταζόταν η κάλυψη των στόχων που αφορούσαν την συμπεριφορά των επιπέδων των οντοτήτων υψηλού μοριακού βάρους και του ελεύθερου Lamp2a.

Το μοντέλο, όπως διαμορφώθηκε από το παρόν βήμα, αποτέλεσε την βάση για την εκτέλεση των διεργασιών της Ανάλυσης Ευαισθησίας και της Εκτίμησης Παραμέτρων που παρουσιάζονται στις ακόλουθες ενότητες.

4.1.3.4.3 Ανάλυση Ευαισθησίας

Όπως παρουσιάστηκε και στο Κεφάλαιο 2, η διαδικασία Ανάλυσης Ευαισθησίας (Sensitivity Analysis), εκτός από τις σημαντικές πληροφορίες που μπορεί να δώσει από μόνη της για τα χαρακτηριστικά του συστήματος, μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στις επιλογές που θα γίνουν για την εκτέλεση της διαδικασίας εκτίμησης παραμέτρων. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της Ανάλυσης Ευαισθησίας, μπορούμε να πληροφορηθούμε για το ποιες είναι οι παράμετροι που επηρεάζουν σημαντικά την συμπεριφορά του συστήματος. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα να εστιαστεί η εκτίμηση παραμέτρων μόνο στις παραμέτρους με αυτή την ιδιότητα, περιορίζοντας έτσι τον χώρο παραμέτρων και μειώνοντας τις ανάγκες σε υπολογιστικό χρόνο αλλά και να αυξήσουμε την ακρίβεια της εκτίμησης παραμέτρων, δεδομένου ότι η εξαντλητική αναζήτηση όλου του χώρου παραμέτρων είναι απαγορευτική για αυτού του μεγέθους αλλά και είδους (μη γραμμικά) προβλήματα.

Για την διενέργεια της συγκεκριμένης διαδικασίας, χρησιμοποιήθηκε η ενσωματωμένη λειτουργία του λογισμικού COPASI, θέτοντας ως μεταβαλλόμενες μεταβλητές όλες τις παραμέτρους και τις αρχικές τιμές του μοντέλου ενώ οι ευαισθησίες υπολογίστηκαν ξεχωριστά για τα επίπεδα της συνολικής μονομερούς στο κυτταρόπλασμα, της συνολικής διμερούς για το ίδιο διαμέρισμα και για το άθροισμα των ολιγομερών σε αυτό (δηλαδή για όσες οντότητες ή αθροίσματα οντοτήτων υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα). Από τις παραμέτρους που προέκυψαν να οδηγούν σε υψηλή ευαισθησία για κάθε μία περίπτωση, κρατήθηκαν αυτές που επηρεάζουν σημαντικά και τις τρεις κατηγορίες οντοτήτων και επιλέχθηκαν να εκτιμηθούν στην διαδικασία εκτίμησης παραμέτρων.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μέθοδος που προσφέρεται μέσω του συγκεκριμένου λογισμικού, αφορά σε τοπική ανάλυση ευαισθησίας σε ντετερμινιστικά πλαίσια (όπως παρουσιάστηκε στην Ενότητα 2.4.1.1. Γι' αυτό το λόγο, όπως δόθηκε και στα βήματα που ακολουθήθηκαν για τη δημιουργία του μοντέλου, επιλέχθηκε η ανάλυση ευαισθησίας να πραγματοποιηθεί αφού πρώτα έχουν βρεθεί κάποιες ικανοποιητικές πρώτες εκτιμήσεις για τις τιμές των παραμέτρων. Σε κάθε περίπτωση, ωστόσο, όπως θα περιγραφεί και στους μελλοντικούς στόχους της εργασίας, σχεδιάζεται η αξιοποίηση πιο εξεζητημένων μεθόδων ανάλυσης ευαισθησίας όπως παρουσιάστηκαν στην προαναφερθείσα ενότητα και η χρήση της ενσωματωμένης λειτουργίας του COPASI (χρησιμοποιώντας τις εξ' ορισμού παραμέτρους για την διαδικασία που δίνουν οι δημιουργοί της εφαρμογής) αποτελεί μία πρώτη προσπάθεια αξιοποίησης της συγκεκριμένης οικογένειας μεθόδων.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης ευαισθησίας (με μεταβλητές όλες τις παραμέτρους αντιδράσεων του συστήματος) δίνονται στους ακόλουθους πίνακες:

Πίνακας 4.12 Αποτελέσματα Ανάλυσης Ευαισθησίας για τη Μονομερή ASYN

Ανάλυση Ευαισθησίας (scaled sensitivities) Συνάρτηση: Επίπεδα Συνολικής Μονομερούς WT ASYN	
$k_{WTasynSynth}$	0,574409000000
$k_{WTasynDopMod}$	0,156937000000
$k_{DopProd}$	0,141511000000
$k_{ProteasomeBind}$	0,050302000000
$k_{DopModWTasynLampBind}$	0,041930100000
$k_{WTasynLysUptk}$	0,002102700000
$k_{ProtOligDegr}$	0,000380270000
$k_{LampFreeWTasyn}$	0,000267912000
$k_{WTasyn2LysUptk}$	0,000267309000
$k_{DisRate}$	0,000173683000
$k_{DopModM/ADegr}$	0,000001971630
$k_{WTasyn2merLysDegr}$	-0,000000429457
$k_{WTasynLysDegr}$	-0,000000792020
$k_{DopMod2merM/ADegr}$	-0,000003158690
$k_{WTOligoBindOnLamp}$	-0,000265849000
$k_{WTasyn1_2merBindOnLamp}$	-0,005391830000
$k_{AggrGrowth}$	-0,006621620000
$k_{DopDegr}$	-0,156613000000
$k_{OligAutophagUptake}$	-0,161592000000
$k_{OligomerForm}$	-0,168131000000
$k_{WTasyn2merForm}$	-0,336953000000

Πίνακας 4.13 Αποτελέσματα Ανάλυσης Ευαισθησίας για τη Διμερή ASYN

Ανάλυση Ευαισθησίας (scaled sensitivities) Συνάρτηση: Επίπεδα Συνολικής Διμερούς WT ASYN	
$k_{WTasynSynth}$	0,767473000000
$k_{WTasyn2merForm}$	0,588037000000
$k_{DopProd}$	0,169186000000
$k_{WTasynDopMod}$	0,156937000000
$k_{DopModWTasynLampBind}$	0,110639000000
$k_{ProteasomeBind}$	0,058108900000
$k_{WTasynLysUptk}$	0,003127600000
$k_{WTasyn2LysUptk}$	0,000432264000
$k_{ProtOligDegr}$	0,000415798000
$k_{LampFreeWTasyn}$	0,000383557000
$k_{DisRate}$	0,000124558000
$k_{DopModM/ADegr}$	0,000006129670
$k_{WTasyn2merLysDegr}$	0,000000388696
$k_{WTasynLysDegr}$	-0,000000438594
$k_{DopMod2merM/ADegr}$	-0,000014362700
$k_{WTOLigoBindOnLamp}$	-0,000382850000
$k_{AggrGrowth}$	-0,007667180000
$k_{WTasyn1_2merBindOnLamp}$	-0,057112400000
$k_{DopDegr}$	-0,214919000000
$k_{OligAutophagUptake}$	-0,359317000000
$k_{OligomerForm}$	-0,980309000000

Πίνακας 4.14 Αποτελέσματα Ανάλυσης Ευαισθησίας για τα ολιγομερή της ASYN

Ανάλυση Ευαισθησίας (scaled sensitivities) Συνάρτηση: Επίπεδα Αθροίσματος Ολιγομερών WT ASYN	
$k_{WTasynSynth}$	1,35056000000
$k_{WTasynDopMod}$	0,36321600000
$k_{WTasyn2merForm}$	0,33177100000
$k_{DopProd}$	0,24167100000
$k_{DopModWTasynLampBind}$	0,23189400000
$k_{WTOligoBindOnLamp}$	0,00021177200
$k_{DopModM/ADegr}$	0,00000337801
$k_{WTasyn2merLysDegr}$	-0,00000162136
$k_{WTasynLysDegr}$	-0,00000309348
$k_{DisRate}$	-0,00002257980
$k_{DopMod2merM/ADegr}$	-0,00002565350
$k_{WTasyn2LysUptk}$	-0,00018962200
$k_{LampFreeWTasyn}$	-0,00022365700
$k_{WTasynLysUptk}$	-0,00084612900
$k_{ProtOligDegr}$	-0,00252914000
$k_{AggrGrowth}$	-0,01124050000
$k_{OligomerForm}$	-0,18485500000
$k_{WTasyn1_2merBindOnLamp}$	-0,25235900000
$k_{ProteasomeBind}$	-0,29913200000
$k_{DopDegr}$	-0,36045800000
$k_{OligAutophagUptake}$	-0,84454700000

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, αποφασίστηκαν οι παράμετροι που επιχειρήθηκε να εκτιμηθούν υπολογιστικά (αποκλείστηκαν οι $k_{WTasynLysDegr}$, $k_{WTasyn2merLysDegr}$, $k_{DopModM/ADegr}$, $k_{DopMod2merM/ADegr}$ λόγω της μειωμένης ευαισθησίας και των τριών μεταβλητών σε αυτές), ενώ επίσης καθοδηγήθηκε η επιλογή του εύρους των διαστημάτων που ορίστηκαν για κάθε μία παράμετρο, ώστε σε αυτά να αναζητηθεί η τιμή τους κατά την εκτίμηση παραμέτρων, διαδικασία που παρουσιάζεται στην ακόλουθη ενότητα.

4.1.3.4.4 Εκτίμηση Παραμέτρων

Τελευταίο βήμα της δημιουργίας και εκπαίδευσης του μοντέλου αποτέλεσε η εκτίμηση παραμέτρων αυτού μέσω των διαθέσιμων δεδομένων που παρουσιάστηκαν στην ενότητα 4.1.3.3. Η επιλογή των παραμέτρων που επιλέχθηκαν ώστε να εκτιμηθούν καθορίστηκε από τα αποτελέσματα της ανάλυσης ευαισθησίας που παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα, από τη γνώση για την επιρροή των διαφόρων παραμέτρων στο σύστημα αλλά και από την αβεβαιότητα που υπήρχε για τις τιμές κάποιων από αυτές λόγω της ελλιπούς πρόσβασης σε πληροφορίες από την βιβλιογραφία. Οι κύριες κατηγορίες παραμέτρων που εκτιμήθηκαν ήταν πρώτον οι ρυθμοί των επιλεγμένων αντιδράσεων και δεύτερον οι αρχικές ποσότητες οντοτήτων για τις οποίες δεν υπήρχε σχετική διαθέσιμη γνώση.

Οι αρχικές τιμές που ορίστηκαν στις υπό εκτίμηση παραμέτρους ήταν αυτές που προέκυψαν από τη χειροκίνητη μικρο-ρύθμιση που παρουσιάστηκε στην ενότητα 4.1.3.4.2 ενώ το εύρος της αναζήτησης της κάθε τιμής της παραμέτρου καθορίστηκε από την πεποίθηση που υπήρχε για την καταλληλότητα της ήδη υπάρχουσας τιμής κάθε παραμέτρου. Ο στόχος του ορισμού όσο το δυνατόν μικρότερων ορίων αναζήτησης ήταν η μείωση του υπολογιστικού κόστους αλλά και η όσο το δυνατόν ακριβέστερη εκτίμηση των τιμών των παραμέτρων στους αναγκαστικά περιορισμένους αριθμούς επαναλήψεων αναζήτησης που πραγματοποιούν οι διάφοροι αλγόριθμοι κατά την εξερεύνηση του χώρου παραμέτρων. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο ορισμός αυτών των ορίων προέκυψε από μία δυναμική διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιήθηκαν πειράματα εκτίμησης παραμέτρων και στη συνέχεια αξιολογήθηκαν τα αποτελέσματά της και τροποποιήθηκαν κατάλληλα τα σχετικά περιθώρια.

Στον ακόλουθο πίνακα δίνονται οι ρυθμοί αντιδράσεων που εκτιμήθηκαν, οι αρχικές τιμές για αυτές και τα σχετικά περιθώρια:

Πίνακας 4.15 Ρυθμίσεις εκτίμησης παραμέτρων

Παράμετρος	Αρχική Τιμή	Περιθώρια
$k_{WTasyn2merForm}$	6.89778e-10	[6.89778e-12 , 6.89778e-08]
$k_{OligomerForm}$	8.1732e-09	[8.1732e-11 , 8.1732e-07]
$k_{ProteasomeBind}$	1.7e-09	[1.7e-11 , 1.7e-07]
$k_{OligAutophagUptake}$	2.38913e-06	[2.38913e-08 , 2.38913e-04]
$k_{LampFreeWTasyn}$	0.001	[0.0001 , 0.01]
$k_{ProtOligDegr}$	3.70096e-05	[3.70096e-06 , 3.70096e-04]
$k_{WTasyn1_2merBindOnLamp}$	4e-08	[4e-10 , 4e-06]
$k_{WTOLigoBindOnLamp}$	4e-08	[4e-10 , 4e-06]
$k_{DisRate}$	5e-09	[5e-11 , 5e-07]
$k_{DopModWTasynLampBind}$	8.268e-08	[8.268e-10 , 8.268e-06]

$k_{WTasynSynth}$	0.011908	[0.0011908 , 0.11908]
$k_{DopProd}$	0.01	[0.001 , 0.1]
$k_{WTasynDopMod}$	5e-08	[5e-10 , 5e-10]
$k_{DopDegr}$	0.001	[0.0001 , 0.01]
$k_{AggrGrowth}$	5e-09	[5e-11 , 5e-07]
$k_{WTasynLysUptk}$	0.001	[0.0001 , 0.01]
$k_{WTasyn2LysUptk}$	0.001	[0.0001 , 0.01]

Όσον αφορά τώρα τις αρχικές ποσότητες που εκτιμήθηκαν, αυτές αφορούσαν την αναλογία μεταξύ τροποποιημένης από Ντοπαμίνη ή όχι WT ASYN κατά την ημέρα της διαφοροποίησης (χρονική στιγμή 0 για την προσομοίωση). Αυτό κατέστη δυνατό για την περίπτωση της μονομερούς και της διμερούς WT ASYN ορίζοντας ότι:

- Τα αρχικά επίπεδα της τροποποιημένης μονομερούς ισούνται με τα αρχικά επίπεδα της συνολικής μονομερούς μείον τα αρχικά επίπεδα της μη τροποποιημένης μονομερούς
- Τα αρχικά επίπεδα της τροποποιημένης διμερούς ισούνται με τα αρχικά επίπεδα της συνολικής διμερούς μείον τα αρχικά επίπεδα της μη τροποποιημένης διμερούς.

Κατόπιν αυτού, τα αρχικά επίπεδα της μη τροποποιημένης μονομερούς και διμερούς εντάχθηκαν στην διαδικασία εκτίμησης παραμέτρων ώστε να συνεκτιμηθούν μαζί με τις ανωτέρω αναφερόμενες παραμέτρους.

Όσον αφορά τώρα την ποσόστωση μεταξύ τροποποιημένων και μη τροποποιημένων ολιγομερών, μία αντίστοιχη διαδικασία όπως για τη μονομερή και τη διμερή δεν ήταν δυνατό να εφαρμοστεί δεδομένου ότι τα διαθέσιμα δεδομένα αφορούσαν μόνο το άθροισμα αυτών και όχι τα επίπεδα των επιμέρους ολιγομερών. Έτσι, αποφασίστηκε η ομοιόμορφη κατανομή των επιπέδων των ολιγομερών στους διάφορους βαθμούς αυτών αλλά και στις δύο μορφές αυτών (τροποποιημένα ή όχι).

Όσον αφορά, τώρα, τα επίπεδα των Οντοτήτων WT ASYN υψηλού μοριακού βάρους (HigherWTasynSPC), γνωρίζοντας από την [87], ότι η πιθανή εμφάνισή τους στο κυτταρικό μοντέλο είναι σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, ορίστηκε στην διαδικασία της εκτίμησης παραμέτρων ένας περιορισμός (Constraint) που όριζε ότι τα επίπεδα αυτών δεν θα ξεπερνούν το 15 σε απόλυτο αριθμό οντοτήτων. Η επιλογή αυτής της τιμής ήταν καθαρά εμπειρική (δεν υπήρχε καμία πηγή πληροφόρησης αριθμητικής μορφής για τα συγκεκριμένα επίπεδα) και αντιστοιχεί στα θεωρούμενα χαμηλά επίπεδα στην κλίμακα των επιπέδων των διαφόρων οντοτήτων του συστήματος.

Σχετικά με τα επίπεδα των ολιγομερών στο πρωτεάσωμα, δεν υπήρχαν κάποια επιπλέον ποσοτικοποιημένα δεδομένα πέραν της γνώσης που παρουσιάστηκε στη σχετική Ενότητα 3.2.3.3.3. Ωστόσο, η γνώση που υπήρχε από το εργαστήριο ήταν ότι στα σχετικά για το πρωτεάσωμα πειράματα που παρουσιάζονται στην προαναφερόμενη

ενότητα, η ποσότητα της ASYN που καταλήγει σε αυτό είναι της τάξεως του 0,5% της συνολικής ASYN στο σύστημα [101]. Έτσι, παρόμοια με την περίπτωση των HigherWTasynSPC ορίστηκε ο περιορισμός, τα олиγομερή που βρίσκονται στο πρωτεάσωμα (δηλαδή να έχουν δημιουργήσει σύμπλοκο με μία από τις οντότητες Proteasome), να μην ξεπερνούν τα 20.

Όλες οι προαναφερθείσες επιλογές εισήχθησαν στο λογισμικό COPASI, στο οποίο επίσης εισήχθησαν και τα διαθέσιμα δεδομένα όπως δόθηκαν στον Πίνακα Πίνακας 4.10. Μέσω του συγκεκριμένου λογισμικού, προσφέρεται η δυνατότητα εκτίμησης παραμέτρων μέσω μεθόδων Ολικής Στοχαστικής Βελτιστοποίησης όπως περιγράφονται στην Ενότητα 2.4.2.1.

Οι λόγοι που οδήγησαν στην επιλογή των συγκεκριμένων αλγορίθμων για την παρούσα φάση ανάπτυξης του μοντέλου και για τα πλαίσια της εργασίας, ήταν η αμεσότητα πρόσβασης σε αυτές αλλά και το συγκριτικά μειωμένο υπολογιστικά κόστος σε σχέση με τις εναλλακτικές μεθόδους Εκτίμησης Παραμέτρων. Επίσης, όπως αναφέρθηκε και στις σχετικές ενότητες του Κεφαλαίου 2, δεν έχουν αναφερθεί μέχρι στιγμής εφαρμογές αυτών των εναλλακτικών μεθόδων σε μοντέλα μεγάλου μεγέθους (όπως το προτεινόμενο από την παρούσα εργασία μοντέλο). Έτσι, παρότι πιστεύεται ότι μέθοδοι που λαμβάνουν υπόψη τον εγγενή θόρυβο του συστήματος αλλά και τον θόρυβο μετρήσεων, θα πρέπει να εφαρμοστούν, στην συγκεκριμένη φάση, επιλέχθηκε να δοκιμαστούν οι μέθοδοι Βελτιστοποίησης με στόχο την απόκτηση εμπειρίας σχετικά με την εφαρμογή της διαδικασίας Εκτίμησης Παραμέτρων και την εξαγωγή πολύτιμων συμπερασμάτων για τη μελλοντική πιθανή βελτίωση του μοντέλου.

Θα πρέπει να σημειωθεί ιδιαίτερα ότι για αρκετές από τις παραμέτρους που εκτιμήθηκαν και παρά τις προσπάθειες (που παρουσιάστηκαν στις προηγούμενες ενότητες) οι τιμές τους να ρυθμιστούν σε όσο το δυνατόν καταλληλότερες τιμές, δεν υπήρχαν ειδικά δεδομένα που θα διασφάλιζαν την ασφαλή εκτίμηση των τιμών τους. Για παράδειγμα, δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα για τις διάφορες οντότητες που έχουν προσδεθεί στον Lamp2a κάθε χρονική στιγμή και έτσι ο συγκεκριμένος ρυθμός δεν μπορεί να εκτιμηθεί άμεσα. Επίσης, δεν υπήρχαν μετρήσεις για τα επίπεδα αρκετών οντοτήτων τους συστήματος και έτσι οι σχετικές με αυτά παράμετροι δεν μπορούσαν να υπολογιστούν άμεσα. Έτσι, έχοντας ως μόνα διαθέσιμα δεδομένα τα επίπεδα της μονομερούς ASYN, της διμερούς ASYN και του αθροίσματος των ολιγομερών αυτής, ένα μέρος του μοντέλου χαρακτηρίζεται ως μη άμεσα παρατηρήσιμο μέσω των δεδομένων. Ακόμα, η πυκνότητα των δεδομένων όσον αφορά τις στιγμές δειγματοληψίας κρίνεται αρκετά μειωμένη σε σχέση με τη συνήθη ποσότητα δεδομένων που χρησιμοποιείται σε αντίστοιχες προσπάθειες μοντελοποίησης.

Σε κάθε περίπτωση, ωστόσο, έχοντας πραγματοποιήσει την σχετική προεργασία, κρίθηκε σκόπιμη η εκτίμηση και αυτών των παραμέτρων στην προσπάθεια προσέγγισης της εργαστηριακής συμπεριφοράς. Δεδομένης, όμως, της μικρής διαθεσιμότητας σε δεδομένα, οι αριθμητικοί έλεγχοι που μπορούν να γίνουν για το αν επετεύχθη αυτή η προσέγγιση είναι περιορισμένοι και όχι πάντα ασφαλείς. Έτσι, σε

κάθε προσπάθεια εκτίμησης παραμέτρων που πραγματοποιήθηκε, η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της βασίστηκε σε δύο κύριες αρχές:

- Πρώτον. στην σύγκριση της Objective Function και του Root Mean Square και
- Δεύτερον στην αξιολόγηση της τήρησης των κριτηρίων συμπεριφοράς του συστήματος όπως τέθηκαν στην Ενότητα 4.1.3.4.2

Οι αλγόριθμοι οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν και δοκιμάστηκαν ήταν οι:

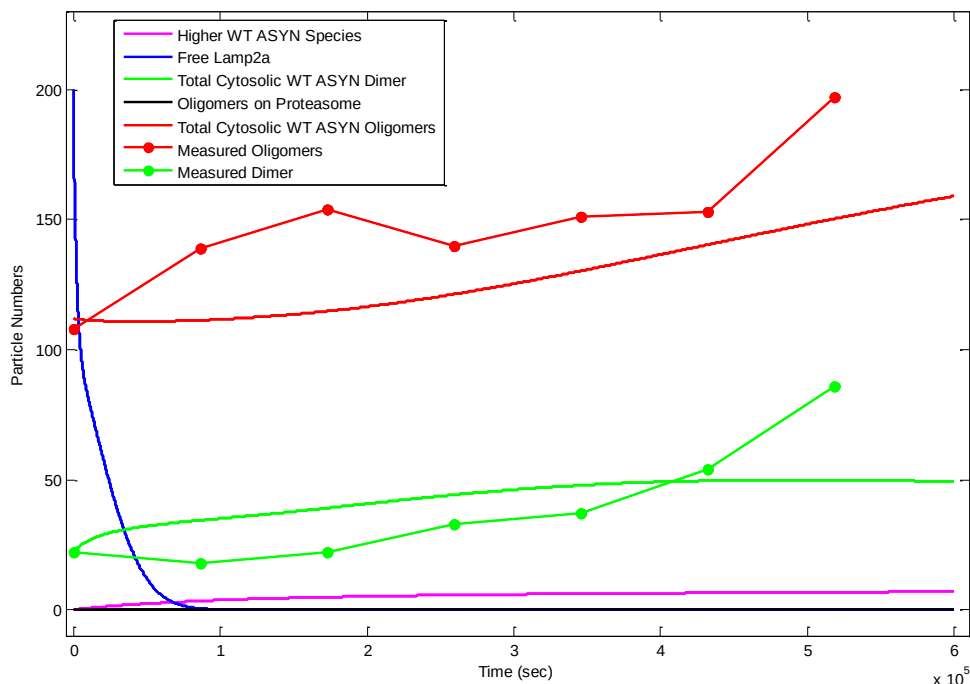
- Genetic Algorithm
- Genetic Algorithm (Stochastic Ranking)
- Evolutionary Strategy (SRES)
- Particle Swarm

οι οποίοι παρουσιάστηκαν στην Ενότητα 2.4.2.1.

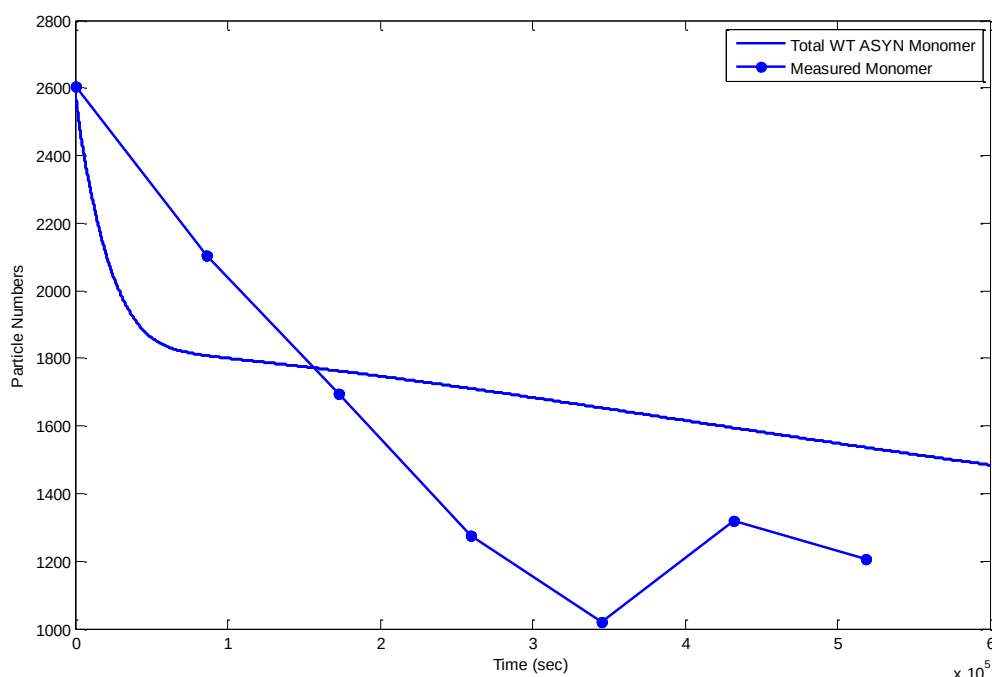
Ακολούθως παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εκτίμησης παραμέτρων μέσω των παραπάνω αλγορίθμων και η αξιολόγηση αυτών βάσει των παραπάνω κριτηρίων. Τα ποσοτικοποιημένα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στον Πίνακα Πίνακας 4.10 ενώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι δεδομένων των Ντετερμινιστικών πλαισίων στα οποία γίνεται η εκτίμηση παραμέτρων, επιλέχθηκε και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, σε πρώτη φάση να γίνει μέσω Ντετερμινιστικής Προσομοίωσης.

Στα ακόλουθα σχήματα, για κάθε περίπτωση αλγορίθμου, παρουσιάζεται η Ντετερμινιστική Προσομοίωση του συστήματος που προκύπτει θέτοντας τις εκτιμηθείσες τιμές των παραμέτρων. Επίσης, παρουσιάζονται τα διαθέσιμα δείγματα για τις διάφορες οντότητες και οι γραμμικές τάσεις για την συμπεριφορά αυτών. Τέλος, δίδεται ένας σύντομος σχολιασμός, σε ποιοτικά πλαίσια, των αποτελεσμάτων του κάθε αλγορίθμου, ενώ η ενότητα ολοκληρώνεται με την σύγκριση αυτών, και σε αριθμητικά πλαίσια, και την επιλογή της καταλληλότερης εκτίμησης παραμέτρων.

Εκτίμηση Παραμέτρων μέσω του Genetic Algorithm



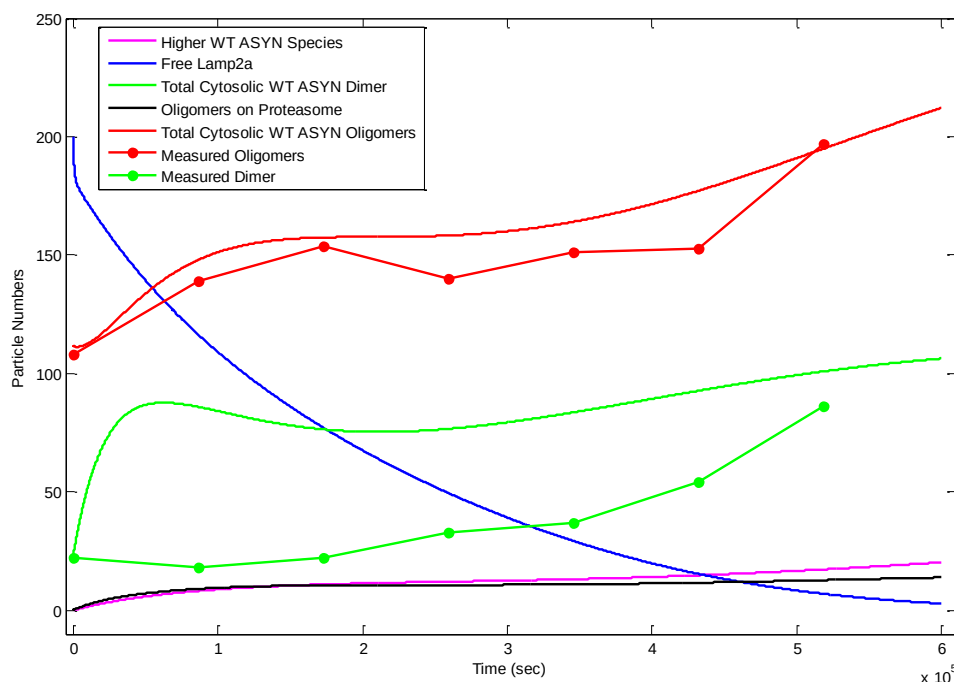
Σχήμα 4.4 Αποτέλεσμα προσομοίωσης μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Genetic Algorithm



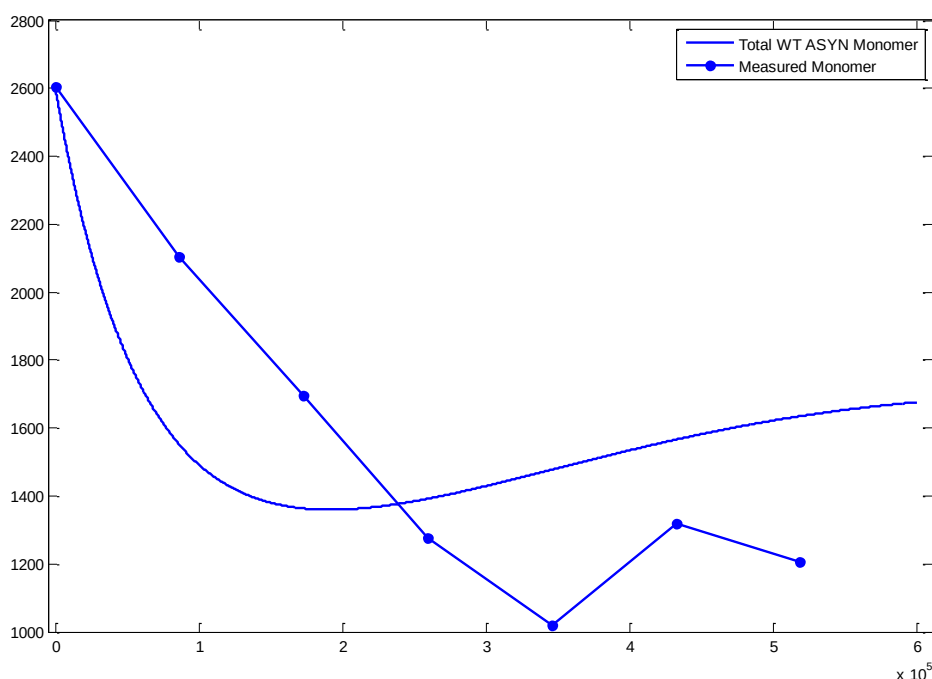
Σχήμα 4.5 Αποτέλεσμα προσομοίωσης (μονομερής WT ASYN) μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Genetic Algorithm

Όπως είναι εύκολα αντιληπτό στα δύο παραπάνω σχήματα, τα αποτελέσματα της εκτίμησης παραμέτρων μέσω του GA οδηγούν σε αποτελέσματα προσομοίωσης στα οποία δεν πληρούνται τα κριτήρια συμπεριφοράς που έχουν τεθεί για καμία από τις οντότητες πέραν των Οντοτήτων Υψηλού Μοριακού Βάρους, που έτσι κι αλλιώς περιορίζονται από τον ορισθέντα περιορισμό.

Εκτίμηση Παραμέτρων μέσω του Genetic Algorithm Stochastic Ranking



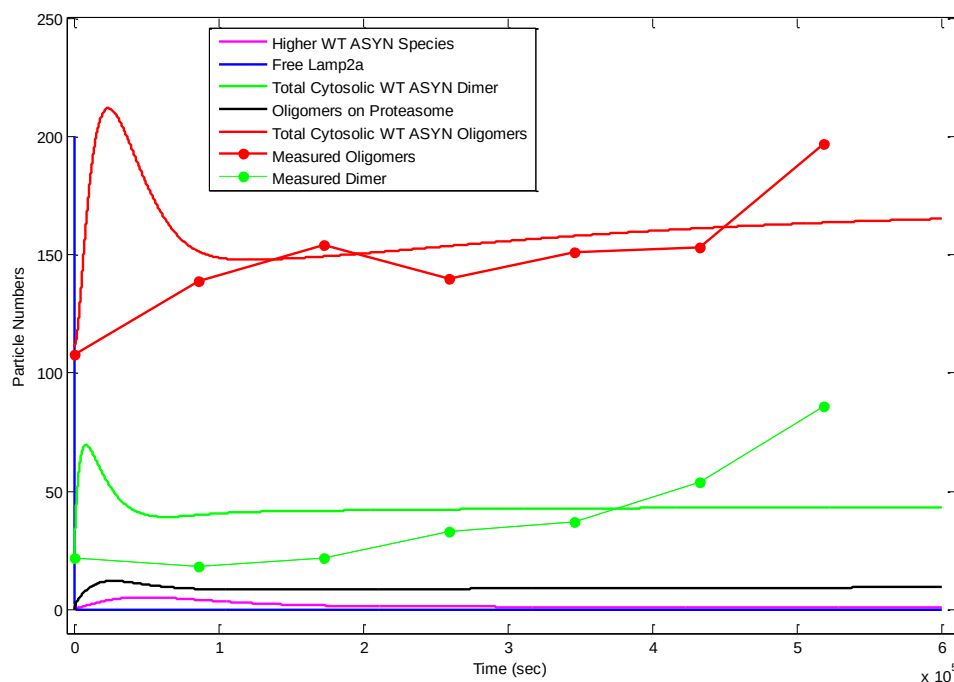
Σχήμα 4.6 Αποτέλεσμα προσομοίωσης μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Genetic Algorithm Stochastic Ranking



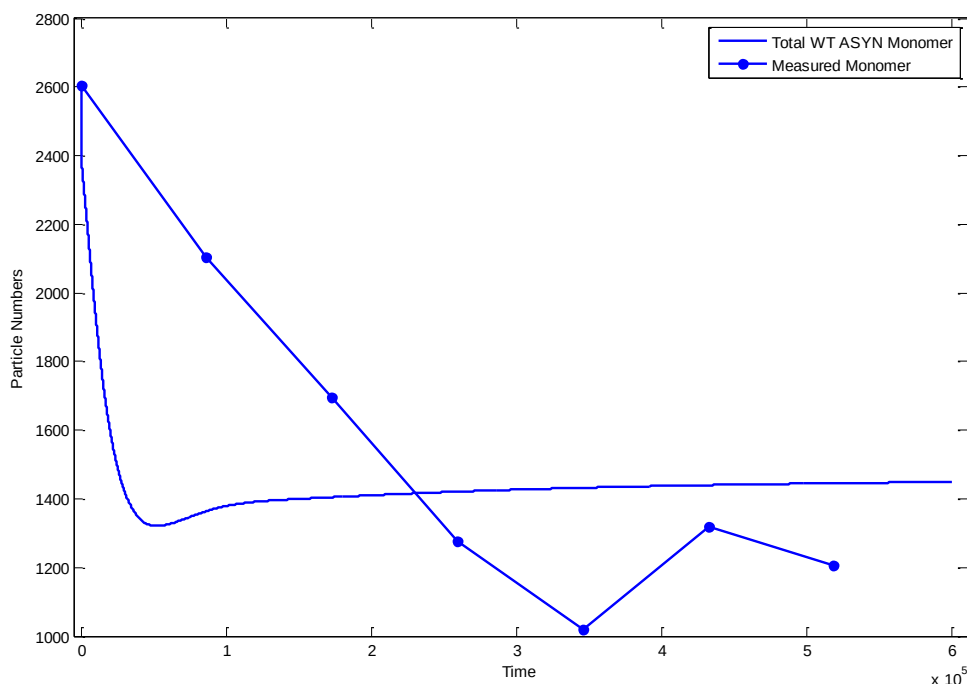
Σχήμα 4.7 Αποτέλεσμα προσομοίωσης (μονομερής WT ASYN) μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Genetic Algorithm Stochastic Ranking

Παρατηρώντας τα ανωτέρω σχήματα, αν και όσον αφορά τα ολιγομερή αλλά και την συμπεριφορά των επιπέδων του ελεύθερου Lamp2a, υπάρχει ικανοποιητική κάλυψη των κριτηρίων, ειδικά για την περίπτωση της διμερούς ASYN, συμπεριφορά των προσομοιωμένων επιπέδων αυτής, αποκλίνει σημαντικά από τα κριτήρια συμπεριφοράς που ορίστηκαν. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι αν και σε αριθμητικά πλαίσια υπάρχουν σημαντικές αποκλίσεις, για την περίπτωση της μονομερούς, εμφανίζεται βελτίωση όσον αφορά την προσομοίωση των τάσεων των επιπέδων αυτής.

Εκτίμηση Παραμέτρων μέσω του Evolutionary Strategy (SRES)



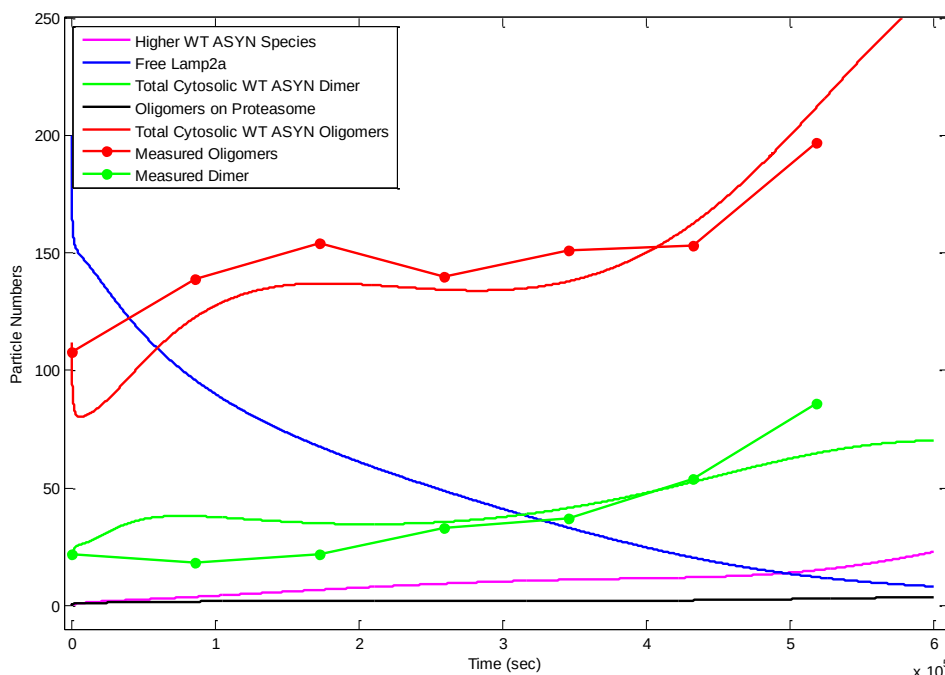
Σχήμα 4.8 Αποτέλεσμα προσομοίωσης μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Evolutionary Strategy



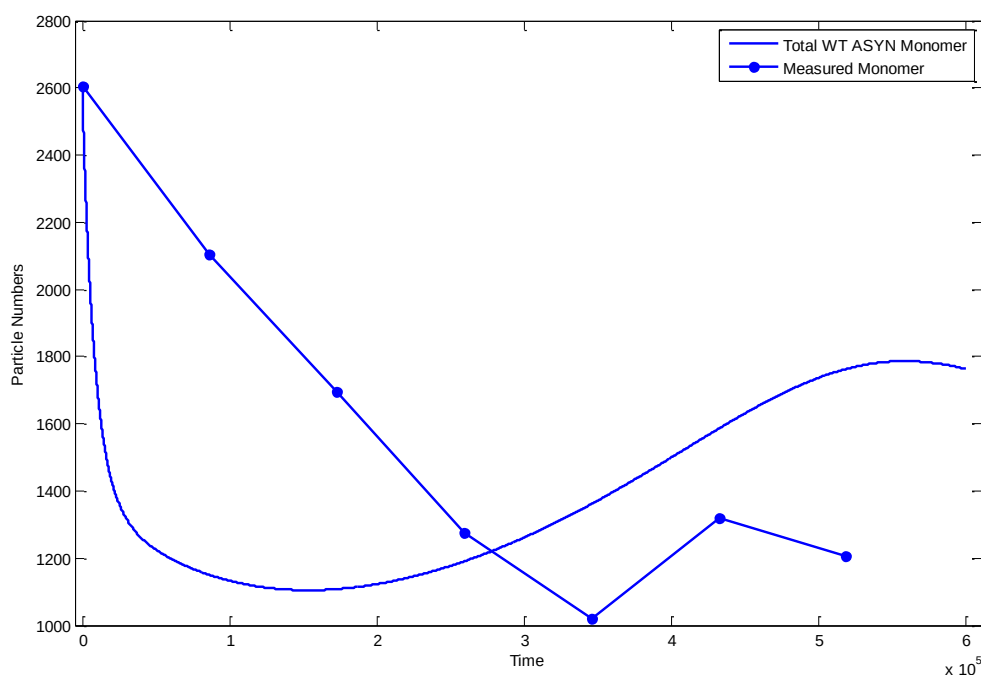
Σχήμα 4.9 Αποτέλεσμα προσομοίωσης (μονομερής WT ASYN) μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Evolutionary Strategy

Όπως είναι εμφανές στα παραπάνω σχήματα, για την περίπτωση του SRES δεν καλύπτονται σε καμία περίπτωση τα κριτήρια συμπεριφορά και μάλιστα με ιδιαίτερα σημαντικές αποκλίσεις.

Εκτίμηση Παραμέτρων μέσω του Particle Swarm



Σχήμα 4.10 Αποτέλεσμα προσομοίωσης μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Particle Swarm



Σχήμα 4.11 Αποτέλεσμα προσομοίωσης (μονομερής WT ASYN) μετά την εκπαίδευση του μοντέλου μέσω του Particle Swarm

Για την περίπτωση του Particle Swarm, τώρα, όπως εμφανίζεται στο Σχήμα 4.10, υπάρχει σημαντική κάλυψη των εν λόγω κριτηρίων και μάλιστα για την περίπτωση των ολιγομερών και της διμερούς, εμφανίζεται σημαντική σύγκλιση και σε αριθμητικά πλαίσια. Όσον αφορά την μονομερή WT ASYN, παρότι η αριθμητική σύγκλιση δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ιδιαίτερα ικανοποιητική (και εμφανίζεται χειρότερη σε σχέση με αυτή που επετεύχθη με τον GASR), υπάρχει μερική κάλυψη του κριτηρίου πτώσης των επιπέδων κατά τις πρώτες ημέρες και επανόδου τους κατά τις τελευταίες.

Στον ακόλουθο πίνακα, συμπυκνώνονται τα ανωτέρω παρουσιαζόμενα συμπεράσματα ενώ δίνονται και τα αριθμητικά αποτελέσματα της διαδικασίας εκτίμησης παραμέτρων.

Πίνακας 4.16 Αξιολόγηση αποτελεσμάτων αλγορίθμων εκτίμησης παραμέτρων

Αλγόριθμος	Κριτήριο							
		Μονομερούς	Διμερούς	Ολιγομερών	Lamp2a	HigherWTasynSPC	Objective Value	RMS
	GA	✗	✗	✗	✗	✓	3218.17	12.3793
	GASR	✓	✗	✓	✓	✓	1934.08	9.59683
	SRES	✗	✗	✗	✗	✗	3723.63	13.316
	PS	✓	✓	✓	✓	✓	2388.07	10.6638

Παρατηρώντας τον παραπάνω πίνακα, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι, παρόλο που με τις παραμέτρους που εκτιμήθηκαν με τον GASR, επιτυγχάνονται καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την αριθμητική σύγκλιση (κάτι που οφείλεται στην καλύτερη προσέγγιση των επιπέδων της μονομερούς), τα πλέον πλήρη αποτελέσματα επιτυγχάνονται με τον PS δεδομένου ότι καλύπτονται όλα τα κριτήρια συμπεριφοράς του συστήματος ενώ και σε επίπεδο RMS δεν εμφανίζονται σημαντικές διαφορές. Έτσι, αποφασίστηκε να υιοθετηθούν οι εκτιμήσεις που ο PS κατέληξε και οι οποίες παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 4.17 Αποτελέσματα εκτίμησης παραμέτρων και αποδεχθείσες τιμές

Παράμετρος	Εκτιμηθείσα Τιμή
$k_{WTasyn2merForm}$	1.46294e-09
$k_{OligomerForm}$	3.3505e-08
$k_{ProteasomeBind}$	3.42469e-09
$k_{OligAutophagUptake}$	2.39034e-08
$k_{LampFreeWTasyn}$	0.000304457
$k_{ProtOligDegr}$	0.000370096
$k_{WTasyn1_2merBindOnLamp}$	6.86546e-07
$k_{WTOligoBindOnLamp}$	4e-06
$k_{DisRate}$	4.99953e-07
$k_{DopModWTasynLampBind}$	7.6716e-09

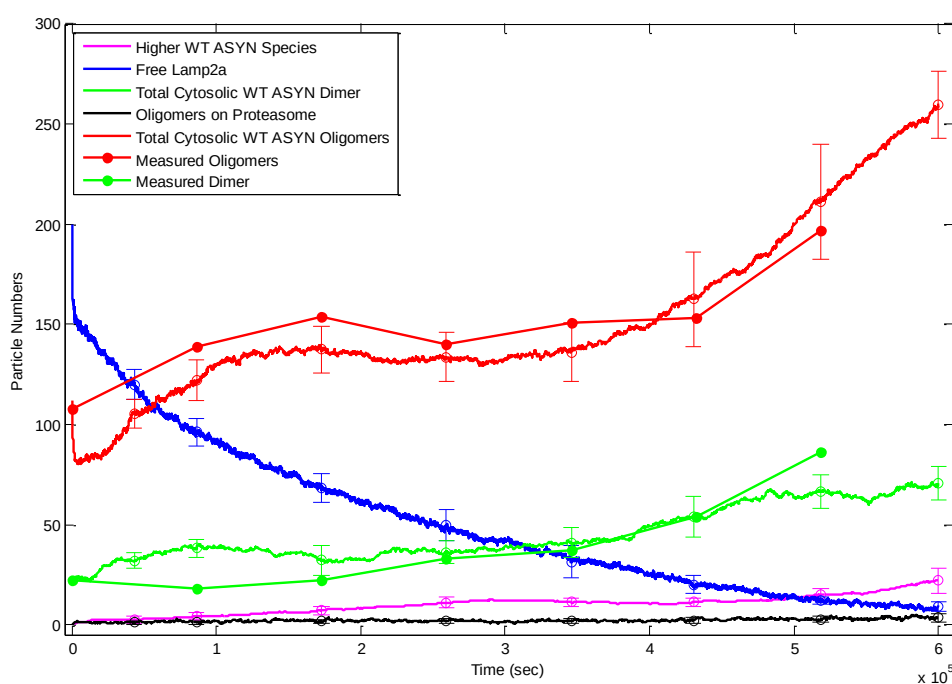
$k_{WTasynSynth}$	0.0294219
$k_{DopProd}$	0.0791823
$k_{WTasynDopMod}$	6.74768e-07
$k_{DopDegr}$	0.00679501
$k_{AggrGrowth}$	4.90556e-07
$k_{WTasynLysUptk}$	0.00999558
$k_{WTasyn2LysUptk}$	0.00995312
Αρχικά Επίπεδα Μονομερούς μη τροποποιημένης WT ASYN	1652
Αρχικά Επίπεδα Μονομερούς τροποποιημένης WT ASYN	2605 - 1652=953
Αρχικά Επίπεδα Διμερούς μη τροποποιημένης WT ASYN	22
Αρχικά Επίπεδα Διμερούς τροποποιημένης WT ASYN	0

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΩΝ ΠΡΟΒΛΕΨΗΣ ΤΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ

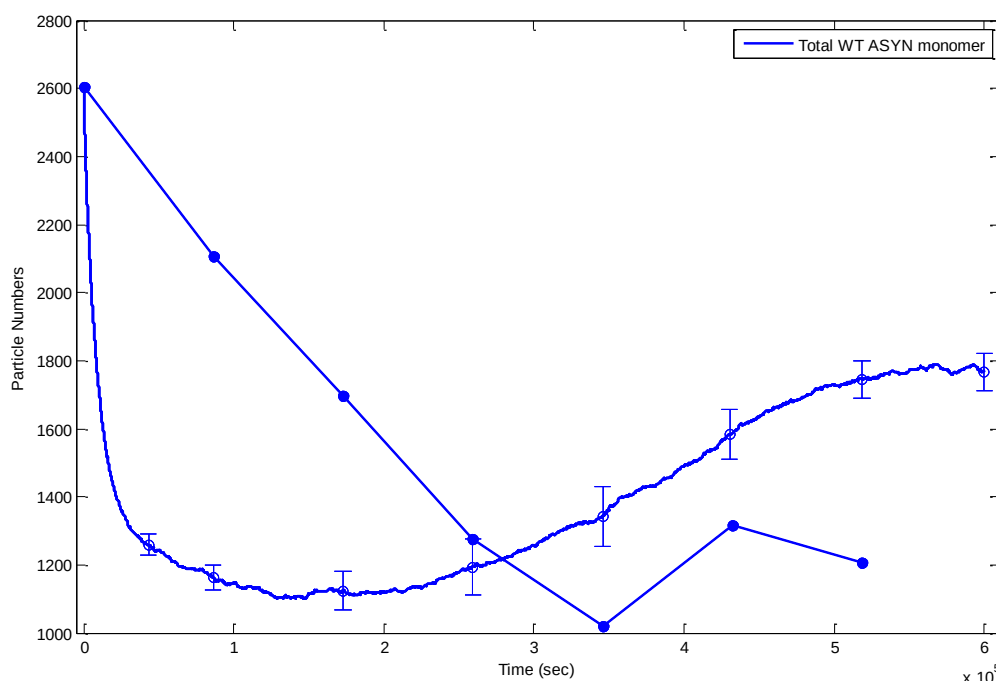
5.1 Προσομοίωση των παρατηρήσιμων φαινομένων. Υπερ-έκφραση της α-συνουκλείνης

Ένας από τους κύριους στόχους ενός μοντέλου Συστημικής Βιολογίας, είναι η ορθή προσομοίωση των βιολογικών φαινομένων μέσω της γνώσης για τα οποία δημιουργήθηκε η δομή του και εκτιμήθηκαν οι παράμετροι αυτού. Για την προσομοίωση του μοντέλου, όπως πρόκυψε έπειτα και από την εκτίμηση παραμέτρων, χρησιμοποιήθηκε ο Στοχαστικός Αλγόριθμος προσομοίωσης Gibson & Brook (Αλγόριθμος Επόμενης Αντίδρασης, Ενότητα 2.2.2.2) ο οποίος έχει υλοποιηθεί στο εργαλείο COPASI. Η επιλογή Στοχαστικού αλγορίθμου έγινε, όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενες ενότητες, για την κάλυψη όσο το δυνατόν περισσότερο του φάσματος συμπεριφοράς του συστήματος ενώ η επιλογή του συγκεκριμένου αλγορίθμου αφορά καθαρά την ταχύτερη εκτέλεση του σε σχέση με τις άλλες μορφές του SSA.

Η προσομοίωση του μοντέλου έγινε για 600.000 δευτερόλεπτα (περίπου 7 ημέρες) και τα αποτελέσματα αυτής δίνονται στα ακόλουθα σχήματα (μέσος όρος 10 εκτελέσεων).



Σχήμα 5.1 Αποτελέσματα στοχαστικής προσομοίωσης προταθέντος μοντέλου. Υπερ-έκφραση της WT ASYN.



Σχήμα 5.2 Αποτελέσματα (μονομερής WT ASYN) στοχαστικής προσομοίωσης προταθέντος μοντέλου. Υπερέκφραση της WT ASYN.

Στα παραπάνω σχήματα, εκτός από το μέσο όρο των 10 προσομοιώσεων, στις χρονικές στιγμές όπου έχουμε διαθέσιμα δεδομένα, παρουσιάζονται τα διαστήματα δύο τυπικών αποκλίσεων που εμφανίζονται μεταξύ των διαφορετικών εκτελέσεων της στοχαστικής προσομοίωσης για τα σημεία αυτά. Επίσης, παρουσιάζονται τα διαθέσιμα δεδομένα και οι τάσεις (trends) που θα πρέπει να εμφανίζει το σύστημα βάσει αυτών.

Όπως είναι εμφανές στο Σχήμα 5.1, η προσομοίωση του μοντέλου οδηγεί σε αποτελέσματα τα οποία για τα επίπεδα του αθροίσματος των ολιγομερών (κόκκινη γραφική) και για τα επίπεδα του διμερούς (πράσινη γραφική), έχουν τιμές ιδιαίτερα κοντά σε αυτές των εργαστηριακών μετρήσεων. Ακόμα μεγαλύτερη αξία, ωστόσο, έχει η κατά πολύ μεγάλο βαθμό ταύτιση της συμπεριφοράς των επιπέδων αυτών των δύο κατηγοριών οντοτήτων, με τις τάσεις που εμφανίζονται στα διαθέσιμα δεδομένα.

Ακόμα, η προσομοιωμένη συμπεριφορά ταυτίζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό με τους στόχους συμπεριφοράς που τέθηκαν στην Ενότητα 4.1.3.4.2. Εν συνεχεία, και για τις οντότητες για τις οποίες δεν υπήρχαν διαθέσιμα ποσοτικά δεδομένα (επίπεδα ελεύθερου Lamp2a, επίπεδα οντοτήτων υψηλού μοριακού βάρους, επίπεδα ολιγομερών στο πρωτεάσωμα), εμφανίζεται ταύτιση με τους στόχους συμπεριφοράς και με την διαθέσιμη ποιοτική γνώση (όπως περιγράφηκε στα προηγούμενα Κεφάλαια). Πιο συγκεκριμένα, οι ελεύθεροι/διαθέσιμοι Lamp2a εμφανίζουν συνεχή μείωση μέχρι τον ουσιαστικό μηδενισμό τους την 7^η ημέρα, ημέρα κατά την οποία αρχίζει να γίνεται εμφανής ο κυτταρικός θάνατος στην εργαστηριακή διαδικασία. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, όπως φαίνεται και από την σχετική γραφική για τα επίπεδα του ελεύθερου Lamp2a, ότι η πτώση αυτών των επιπέδων δεν σημαίνει κατ' ανάγκην ότι υπάρχει συνεχής καταπίεση ενός υποδοχέα από μία μοριακή οντότητα, αλλά αυτός ο υποδοχέας μπορεί να απελευθερώνεται, με αποτέλεσμα την αυξομείωση των σχετικών επιπέδων. Έτσι, η

συμπεριφορά της σχετικής καμπύλης, επηρεάζεται από την καταπίεση κάποιων υποδοχέων αλλά και από την ίδια την πρωτεολυτική διαδικασία.

Όσον αφορά, τα επίπεδα των οντοτήτων υψηλού μοριακού βάρους, παρατηρούμε ότι αυτά παραμένουν σε ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα (όπως ήταν επιθυμητό βάσει της γνώσης που δίνεται στην [87]) τα οποία είναι κατά πολύ μικρότερα σε σχέση με αυτά των ολιγομερών. Τέλος, τα επίπεδα των ολιγομερών που βρίσκονται στο πρωτεάσωμα εμφανίζονται να συμφωνούν με τα αναμενόμενα (όπως περιγράφεται σε προηγούμενες Ενότητες, τα μόρια της ASYN που βρίσκονται στο πρωτεάσωμα αφορούν σε ένα μικρό ποσοστό, 0,05%, της συνολικής ASYN στο σύστημα).

Στο Σχήμα 5.2, τώρα, εμφανίζονται τα επίπεδα της μονομερούς WT ASYN όπως προσομοιώνονται από το μοντέλο. Όπως είναι εύκολα αντιληπτό, στην περίπτωση της συγκεκριμένης οντότητας, δεν έγινε κατορθωτή η ικανοποιητική αριθμητική ταύτιση των αποτελεσμάτων της προσομοίωσης με τις εργαστηριακές μετρήσεις. Ωστόσο, σε έναν ικανοποιητικό βαθμό η συμπεριφορά του μοντέλου κατά την προσομοίωση παρουσιάζει κοινά χαρακτηριστικά με την συμπεριφορά που ορίζουν οι τάσεις των διαθέσιμων δεδομένων και πιο συγκεκριμένα, η σταδιακή πτώση των επιπέδων της μονομερούς τις πρώτες ημέρες και επακόλουθη αύξηση της τις τελευταίες ημέρες. Ο λόγος που δεν έγινε εφικτή η ικανοποιητική ταύτιση με τα δεδομένα πιστεύεται ότι αποτελεί ο ιδιαίτερα μικρός αριθμός αυτών και όπως θα περιγραφεί και στο κεφάλαιο των συμπερασμάτων, σχεδιάζεται η μελλοντική επανεκπαίδευση του μοντέλου με δεδομένα μεγαλύτερης πυκνότητας αλλά και ακρίβειας, κάτι που θεωρείται πως θα οδηγήσει σε πολύ υψηλότερο βαθμό σύγκλισης των αποτελεσμάτων προσομοίωσης με αυτά. Σε κάθε περίπτωση, δεδομένου του γενικότερου στόχου της απόδειξης της χρησιμότητας ενός μοντέλου Συστημικής Βιολογίας στις έρευνες σχετικά με την α-συνουκλεΐνη, ο παρόν βαθμός ταύτισης με τα δεδομένα (για τα επίπεδα της μονομερούς) μπορεί να θεωρηθεί επαρκής μιας και δεν προβλέπει διαφορετικά σημαντικά φαινόμενα σε σχέση με τα επίπεδα αυτής.

5.2 Ικανότητες Πρόβλεψης

Παρά την ιδιαίτερη χρησιμότητα της προσομοίωσης των συνθηκών για τις οποίες έχει εκπαιδευτεί ένα μοντέλο Συστημικής Βιολογίας, όπως αναφέρθηκε και στα εισαγωγικά κεφάλαια της εργασίας, βασικό και εξέχον χαρακτηριστικό του χώρου αυτού είναι η δυνατότητα πρόβλεψης της συμπεριφοράς του βιολογικού συστήματος και του ελέγχου υποθέσεων σχετικά με αυτό. Αυτή η δυνατότητα δίνεται τροποποιώντας τα χαρακτηριστικά του μοντέλου, είτε αυτά αφορούν τη δομή του είτε αυτά αφορούν τις διάφορες τιμές των παραμέτρων του.

Στην περίπτωση του μοντέλου που αναπτύχθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, επιλέχθηκε να δοκιμαστούν τρεις υποθέσεις, για τις οποίες υπήρχε σχετική γνώση είτε από τη βιβλιογραφία είτε από εργαστηριακά ευρήματα ώστε να είναι δυνατή η επιβεβαίωση της ορθότητας της πρόβλεψης. Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να σημειωθεί ότι, για τα σενάρια τροποποιήσεις παραμέτρων που θα παρουσιαστούν ακολούθως δεν υπήρξε καμία ενημέρωση του μοντέλου για αυτά με τη μορφή δεδομένων ή με κατάλληλη εκπαίδευση. Η μόνη γνώση που διέθετε το μοντέλο ήταν η

δομή του συστήματος και αυτή που προέκυψε από την διαδικασία εκπαίδευσης με τα διαθέσιμα δεδομένα που αφορούσαν στην περίπτωση της υπέρ-έκφρασης της ASYN χωρίς κάποια άλλη παρέμβαση στο σύστημα.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι για τον έλεγχο της ορθότητας των προβλέψεων, η διαθέσιμη γνώση αφορούσε κυρίως στην εμφάνιση μειωμένου κυτταρικού θανάτου, όταν αυτά τα σενάρια εφαρμόζονται στο εργαστήριο, και όχι σε πλήρως ποσοτικοποιημένες μετρήσεις κάποιων από τις οντότητες που εντάσσονται στο μοντέλο. Δεδομένου όμως ότι τα επίπεδα της ASYN αλλά και η καταπίεση του CMA έχουν συσχετιστεί με τον κυτταρικό θάνατο αλλά και της υπόθεσης ότι τα ολιγομερή της ASYN είναι τοξικά για το κύτταρο, η παρακολούθηση των επιπέδων αυτών των οντοτήτων, κατά την δοκιμή των σεναρίων, μπορεί να δώσει κάποιες ενδείξεις για την προβλεπόμενη μείωση του κυτταρικού θανάτου.

Τα σενάρια που επιλέχθηκε να δοκιμαστούν ήταν:

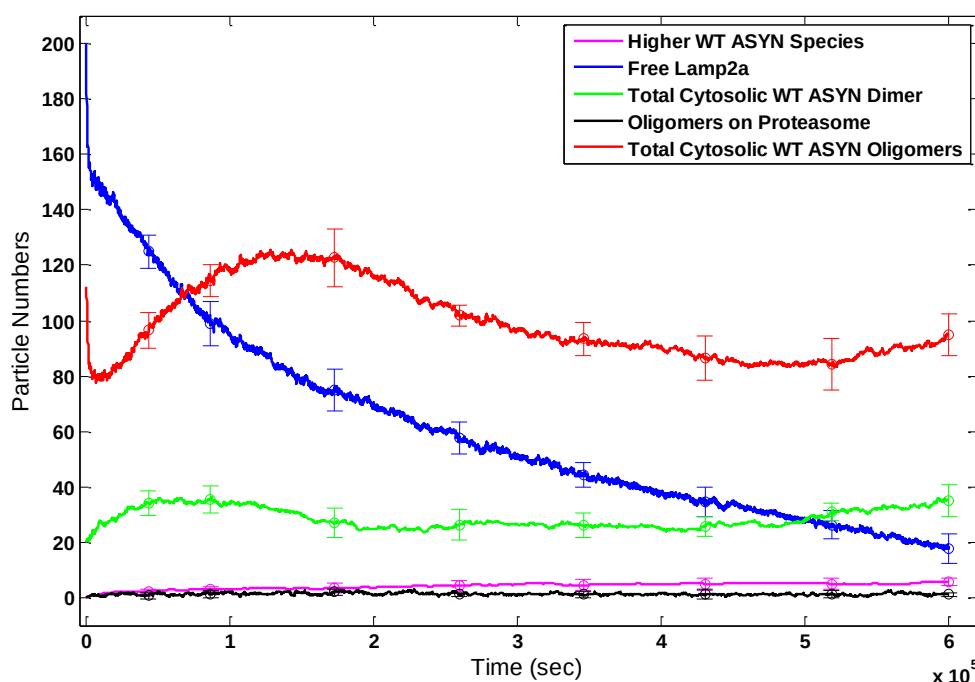
1. Μείωση του ρυθμού παραγωγής της ASYN κατά 50% σε σχέση με τον ρυθμό που εκτιμήθηκε από τα δεδομένα. Με αυτό τον τρόπο επιχειρείται να ελεγχθεί αν το μοντέλο συμπεριλαμβάνει στα βασικά χαρακτηριστικά της συμπεριφοράς του, την συσχέτιση μεταξύ της υπερ-έκφρασης της ASYN και του κυτταρικού θανάτου όπως περιγράφεται στην [87].
2. Τριπλασιασμός των επιπέδων του Lamp2a για την επιβεβαίωση πρόσφατων εργαστηριακών δεδομένων (μη δημοσιευμένα την περίοδο συγγραφής της παρούσας) και της συσχέτισης που υπάρχει μεταξύ της καταπίεσης του CMA και του κυτταρικού θανάτου.
3. Απενεργοποίηση της παραγωγής Ντοπαμίνης για την επιβεβαίωση του μειωμένου κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται όπως περιγράφεται στην [88].

Πριν την παρουσίαση των προβλέψεων μέσω του μοντέλου είναι ιδιαίτερα σημαντικό να σημειωθεί ότι οι σχετικές προσομοιώσεις, παρά τις τροποποιήσεις στις ανάλογες παραμέτρους, δεν εμφανίζουν τροποποιήσεις στις αρχικές συνθήκες προσομοίωσης του συστήματος. Έτσι, όλες οι δοκιμαζόμενες υποθέσεις έχουν ως βάση ένα μοντέλο του οποίου οι αρχικές συνθήκες αλλά και οι ρυθμοί των αντιδράσεων αφορούν σε συνθήκες υπερ-έκφρασης της ASYN, όπως αυτές υπολογίστηκαν από τα διαθέσιμα δεδομένα. Κατά αυτόν τον τρόπο οι συγκεκριμένες *in silico* δοκιμές έχουν τον χαρακτήρα παρέμβασης στο ήδη υπερ-εκφράζον την ASYN σύστημα (αντίστοιχης κάποιας φαρμακευτικής). Μάλιστα, ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι ότι δεν απαιτεί τη χρήση επιπλέον δεδομένων.

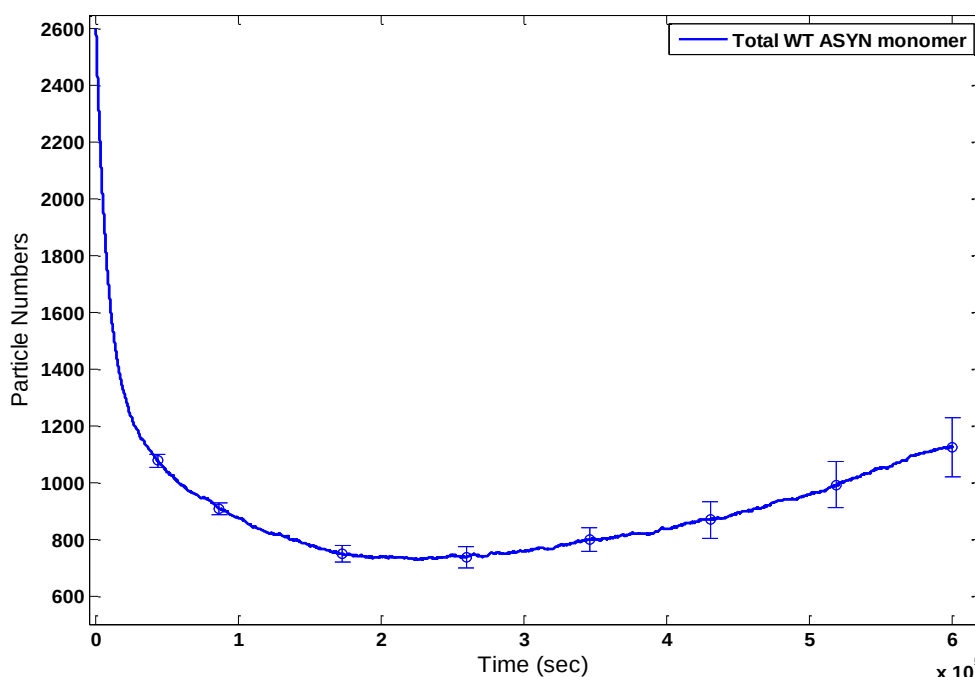
Στις ακόλουθες υποενότητες παρουσιάζονται τα αποτελέσματα προσομοίωσης των συγκεκριμένων σεναρίων.

5.2.1 Έλεγχος υπόθεσης μείωσης του ρυθμού παραγωγής της α-συνουκλείνης

Για την προσομοίωση του σεναρίου της μείωσης του ρυθμού παραγωγής της ASYN κατά 50% (σε σχέση με τον ρυθμό που υπολογίστηκε από τα διαθέσιμα δεδομένα), αρκεί η μείωση κατά 50% της παραμέτρου της αντίδρασης δημιουργίας WTasyn από την SOURCE. Κάτι τέτοιο μπορεί να γίνει άμεσα με οποιοδήποτε σχετικό εργαλείο και τα αποτελέσματα της προσομοίωσης δίνονται στα ακόλουθα σχήματα.



Σχήμα 5.3 Πρόβλεψη συμπεριφοράς συστήματος κατά την μείωση της υπερ-έκφρασης της WT ASYN κατά 50%.



Σχήμα 5.4 Πρόβλεψη συμπεριφοράς (μονομερής WT ASYN) συστήματος κατά την μείωση της υπερ-έκφρασης της WT ASYN κατά 50%.

Τα συμπεράσματα που μπορούν να εξαχθούν από το Σχήμα 5.3, είναι ότι στην περίπτωση της μείωσης έκφρασης της ASYN, τα φαινόμενα του διμερισμού και του ολιγομερισμού παρουσιάζονται ιδιαίτερα μειωμένα. Πιο συγκεκριμένα, και τα διμερή αλλά και τα ολιγομερή, παρουσιάζονται τις τελευταίες ημέρες (τις κρίσιμες ημέρες που εμφανίζεται ο κυτταρικός θάνατος) να βρίσκονται στα επίπεδα που είχαν κατά τις πρώτες ημέρες. Επίσης, αν και τα επίπεδα του ελεύθερου Lamp2a μειώνονται και σε αυτή την περίπτωση σημαντικά, κατά την τελευταία ημέρα της προσομοίωσης δεν βρίσκονται σε μηδενικά επίπεδα, ενώ θα πρέπει να σημειωθεί ξανά ότι η μείωση των

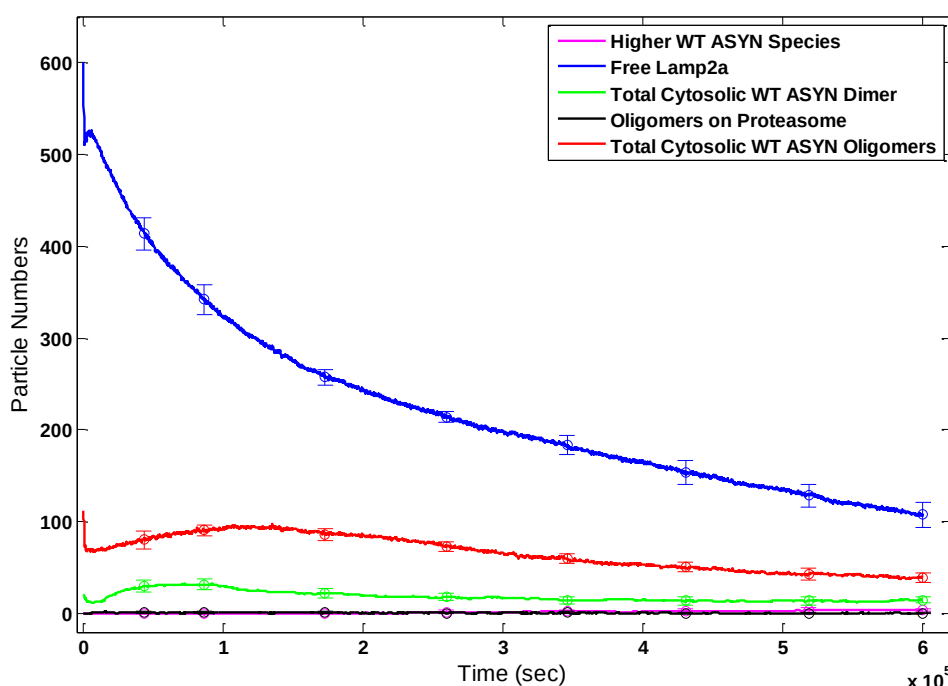
επιπέδων του δεν οφείλεται κατ' ανάγκη μόνο στην καταπίεση αυτού αλλά και στην φυσιολογική του λειτουργία (που βέβαια λόγω των επίσης υψηλών επιπέδων ASYN μπορεί να υπερ-φορτώνεται).

Παρατηρώντας το Σχήμα 5.4, τώρα, είναι εμφανές ότι γενικά τα επίπεδα της μονομερούς ASYN βρίσκονται σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με αυτά στο Σχήμα 5.2. Κάτι τέτοιο, πιθανόν οφείλεται και στα υψηλότερα επίπεδα ελεύθερου Lamp2a κάτι που επιτρέπει την αποτελεσματικότερη αποδόμησή της.

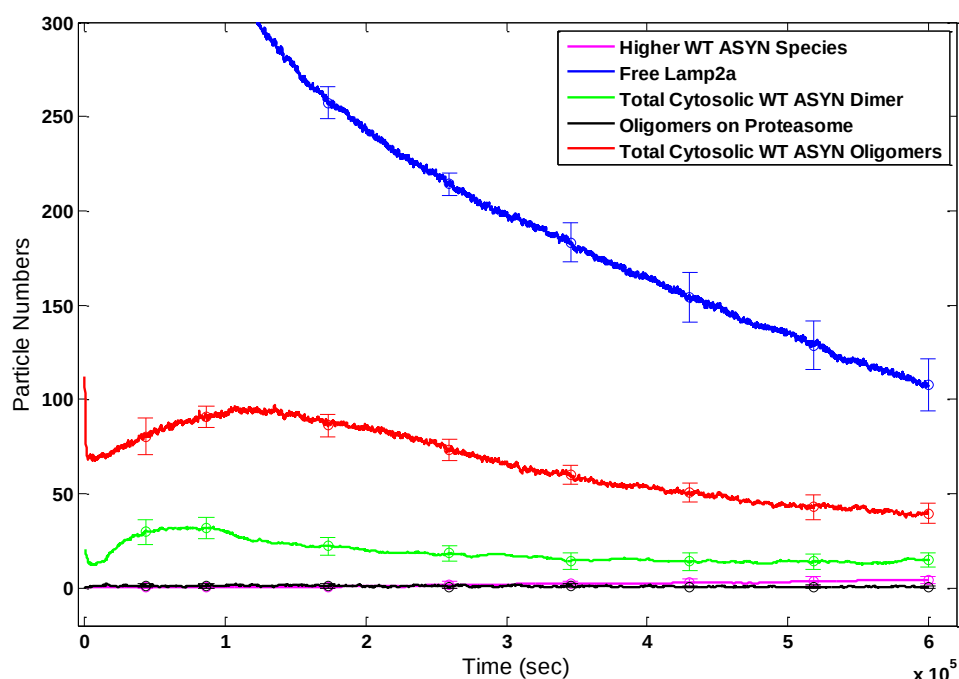
Συνολικά, αυτό που παρατηρείται είναι μία μείωση των σχετικών με την υπέρ-έκφραση της ASYN φαινομένων, ενώ όσον αφορά τον κυτταρικό θάνατο, δεδομένου ότι τα επίπεδα των ολιγομερών παραμένουν σε χαμηλότερα επίπεδα και ότι δεν επέρχεται πλήρης κορεσμός του Lamp2a, μπορούμε να πούμε ότι με την συγκεκριμένη τροποποίηση, το μοντέλο προβλέπει ότι τουλάχιστον για την 7^η ημέρα, τα επίπεδα του κυτταρικού θανάτου θα είναι μειωμένα.

5.2.2 Έλεγχος υπόθεσης τριπλασιασμού των επιπέδων του υποδοχέα Lamp2a

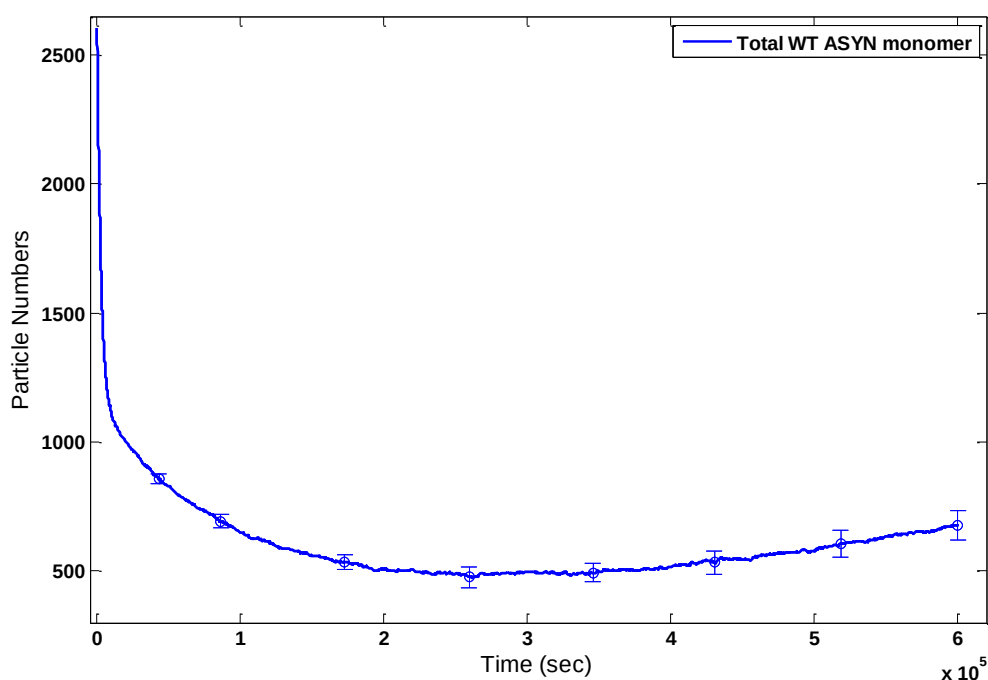
Για τον έλεγχο της υπόθεσης του τριπλασιασμού των επιπέδων του υποδοχέα Lamp2a, τα οποία αρχικά είχαν οριστεί σε αριθμό υποδοχέων 200, αρκεί να τροποποιήσουμε τα σχετικά επίπεδα πριν την έναρξη της προσομοίωσης σε 600. Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης αυτής δίνονται στα παρακάτω σχήματα



Σχήμα 5.5 Πρόβλεψη συμπεριφοράς συστήματος κατά τον τριπλασιασμό των επιπέδων του Lamp2a



Σχήμα 5.6 Πρόβλεψη συμπεριφοράς συστήματος κατά τον τριπλασιασμό των επιπέδων του Lamp2a (παρουσίαση σε περιορισμένα επίπεδα).



Σχήμα 5.7 Πρόβλεψη συμπεριφοράς (μονομερής WT ASYN) συστήματος κατά τον τριπλασιασμό των επιπέδων του Lamp2a

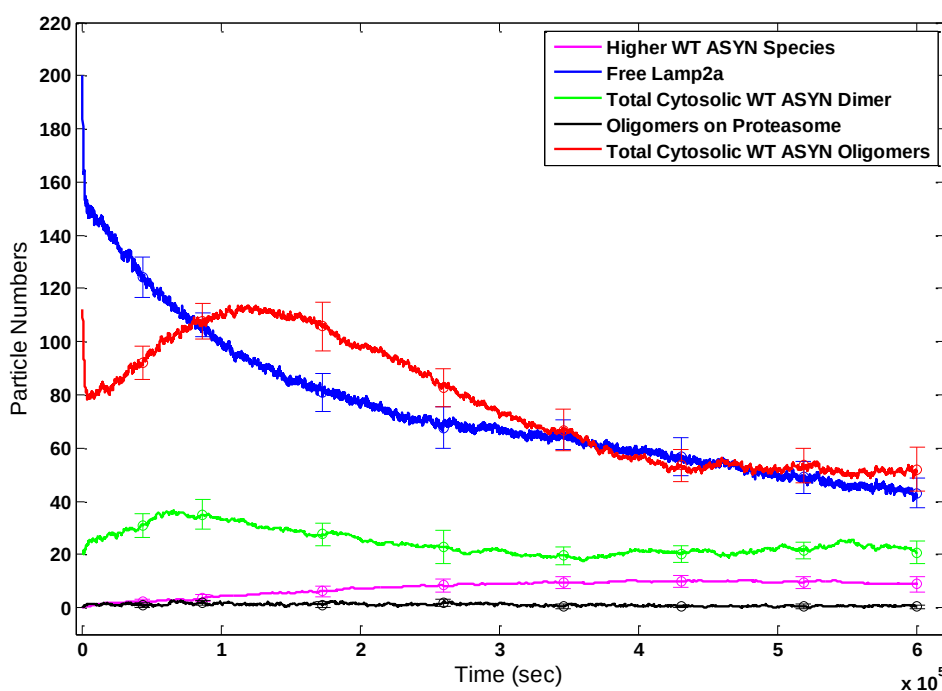
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.5 αλλά και στο Σχήμα 5.6 που αποτελεί μεγέθυνση τμήματος του πρώτου, στην συγκεκριμένη περίπτωση το μοντέλο προβλέπει ότι τα επίπεδα των διμερών και κυρίως ολιγομερών καταλήγουν την τελευταία μέρα της προσομοίωσης σε επίπεδα χαμηλότερα από αυτά που είχαν την ημέρα έναρξης της προσομοίωσης. Επίσης, τα επίπεδα του ελεύθερου Lamp2a κατά την τελευταία μέρα της προσομοίωσης βρίσκονται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το 0 και μάλιστα σε επίπεδα στα οποία βρίσκεται στις πρώτες μόλις στιγμές της προσομοίωσης με τις αρχικές παραμέτρους. Επίσης θα πρέπει να σημειωθούν τα σημαντικά

χαμηλότερα επίπεδα εμφάνισης οντοτήτων υψηλού μοριακού βάρους, ενώ και τα επίπεδα της μονομερούς στο Σχήμα 5.7, βρίσκονται σε ακόμα χαμηλότερα επίπεδα με ξεκάθαρα μειωμένη τάση ανόδου κατά τις τελευταίες μέρες σε σχέση με αυτή που παρουσιάζεται για τις αρχικές παραμέτρους αλλά και για τον προηγούμενο σενάριο.

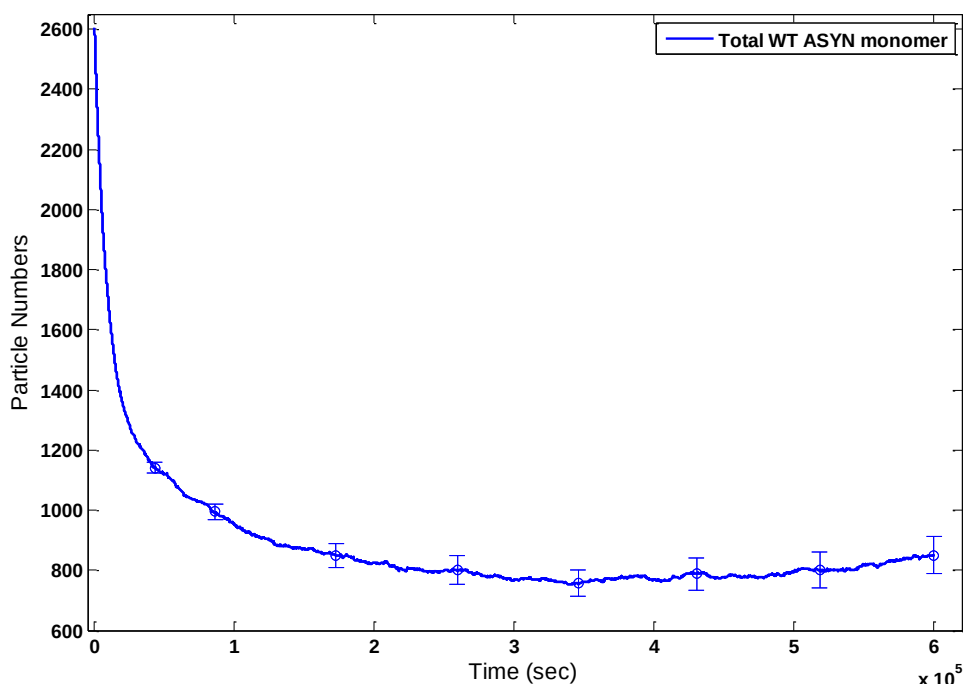
Καταλήγοντας, και στην συγκεκριμένη περίπτωση, το μοντέλο προβλέπει μειωμένο κυτταρικό θάνατο (στα πλαίσια των μειωμένων/συνεχώς μειούμενων ολιγομερών) κάτι που συμφωνεί με πρόσφατα ευρήματα του εργαστηρίου Βασικής Νευροβιολογίας του ΙΙΒΕΑΑ, τα οποία δεν είχαν δημοσιευτεί την περίοδο συγγραφής της παρούσας εργασίας. Στα συγκεκριμένα πειράματα, είχαν (τουλάχιστον) τριπλασιαστεί τα επίπεδα του Lamp2a σε SH-SY5Y κύτταρα και τα γενικότερα συμπεράσματα ήταν η μείωση των επιπέδων της μονομερούς ASYN αλλά και μείωση στον παρατηρούμενο κυτταρικό θάνατο.

5.2.3 Έλεγχος υπόθεσης απενεργοποίησης της παραγωγής Ντοπαμίνης

Με βάση τα όσα έχουν περιγραφεί στις προηγούμενες ενότητες σχετικά με τον ρόλο της Ντοπαμίνης στα παρατηρούμενα φαινόμενα, ιδιαίτερα σημαντικό κρίθηκε να ελεγχθεί η υπόθεση της καταστολή παραγωγής της Ντοπαμίνης. Ως οδηγός για την μελέτη του συγκεκριμένου σεναρίου αποτέλεσαν τα ευρήματα που παρουσιάζονται στην [88] και έχουν αναφερθεί και σε προηγούμενες ενότητες της εργασίας κατά τα οποία, η κατάλληλη απενεργοποίηση του βιολογικού μονοπατιού παραγωγής της Ντοπαμίνης σε διαφοροποιημένα SH-SY5Y κύτταρα, οδηγεί σε ιδιαίτερα σημαντική μείωση του παρατηρούμενου αριθμού κυττάρων που οδηγούνται σε θάνατο καθώς επίσης και σε σημαντική αποκατάσταση της λυσοσωμικής πρωτεολυτικής διαδικασίας. Τα αποτελέσματα της προσομοίωσης του σεναρίου κατά το οποίο ο ρυθμός παραγωγής της Dopamine από τη SOURCE έχει τεθεί στο 0 (σημειώνεται, εκ νέου, ότι τα αρχικά επίπεδα της Dopamine είναι ίδια με αυτά του αρχικού μοντέλου), δίνονται στα παρακάτω σχήματα.



Σχήμα 5.8 Πρόβλεψη συμπεριφοράς συστήματος κατά την απενεργοποίηση της παραγωγής της Ντοπαμίνης



Σχήμα 5.9 Πρόβλεψη συμπεριφοράς (μονομερής WT ASYN) συστήματος κατά την απενεργοποίηση της παραγωγής της Ντοπαμίνης

Όπως μπορεί να γίνει αντιληπτό στο Σχήμα 5.8 και σε αυτό το σενάριο τα διμερή εμφανίζονται να καταλήγουν σε επίπεδα παρόμοια των αρχικών, ενώ τα ολιγομερή καταλήγουν σε επίπεδα μικρότερα αυτών από τα οποία βρίσκονταν στην αρχή της προσομοίωσης καθώς επίσης και οι υποδοχείς Lamp2a δεν εμφανίζουν κορεσμό κατά την τελευταία ημέρα της προσομοίωσης. Επιπροσθέτως στο Σχήμα 5.9 τα επίπεδα της μονομερούς ASYN παρουσιάζονται και σε αυτή την περίπτωση σημαντικά μειωμένα ενώ εμφανίζουν την μικρότερη τάση αύξησης κατά τις τελευταίες ημέρες σε σχέση με όλα τα σενάρια που παρουσιάστηκαν σε προηγούμενες ενότητες. Τέλος, ιδιαίτερα σημαντικό αποτέλεσμα αποτελεί η πρόβλεψη του μοντέλου για την εμφάνιση σημαντικού αριθμού οντοτήτων υψηλού μοριακού βάρους. Πιο συγκεκριμένα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.8, τα επίπεδα των συγκεκριμένων οντοτήτων προβλέπεται ότι βρίσκονται σε επίπεδα παρόμοια με αυτά της προσομοίωσης με τις αρχικές παραμέτρους του μοντέλου, παρόλο που σε αντίθεση με την αρχική προσομοίωση, στην παρούσα περίπτωση τα επίπεδα των ολιγομερών είναι κατά πολύ μικρότερα. Μία προφανής εξήγηση του συγκεκριμένου αποτελέσματος θα μπορούσε να είναι ο σχεδόν αποκλειστικός ολιγομερισμός της ASYN μόνο μέσα από το σχετικό με την μη τροποποιημένη ASYN μονοπάτι (σε αυτό που συμμετέχουν οι χρωματισμένες με κόκκινο χρώμα οντότητες στην Εικόνα 4.3). Ωστόσο, μία επιπρόσθετη εξήγηση, λαμβάνοντας υπόψη και τα χαμηλότερα επίπεδα της μονομερούς ASYN, θα μπορούσε να αντληθεί από την υπόθεση που περιγράφεται στις [115, 116], ότι ο σχηματισμός των οντοτήτων υψηλού μοριακού βάρους, μπορεί τελικά να δρα προστατευτικά για το κύτταρο, επιτρέποντάς του να αποθηκεύσει σε δομές την πλεονάζουσα ASYN η οποία δεν μπορεί να αποδομηθεί πλήρως από τους πρωτεολυτικούς μηχανισμούς.

Συνοψίζοντας, καταλήγουμε ότι και για τα τρία σενάρια που παρουσιάστηκαν παραπάνω, το προτεινόμενο μοντέλο καταφέρνει να δώσει αληθοφανείς προβλέψεις, οι

οποίες ταυτίζονται με την ποιοτική γνώση που διαθέτουμε για τα αντίστοιχα εργαστηριακά πειράματα, ενώ παρότι επί του παρόντος δεν ήταν εφικτή η λεπτομερής σύγκριση, σε ποσοτικό επίπεδο, των σχετικών αποτελεσμάτων, οι σχετικές μεταβολές των επιπέδων των διαφόρων οντοτήτων, κρίθηκαν αναμενόμενες από τα μέλη του συνεργαζόμενου εργαστηρίου. Τα αποτελέσματα αυτά, αποτελούν σημαντική ένδειξη ότι το συγκεκριμένο μοντέλο μπορεί να αποτελέσει βάση για την ανάπτυξη ενός εργαλείου που θα είναι ικανό να προβλέπει με σημαντική ακρίβεια την συμπεριφορά του βιολογικού συστήματος, όταν σε αυτό πραγματοποιούνται παρεμβάσεις, στοχεύοντας έτσι να συμβάλει στον αποδοτικότερο σχεδιασμό πειραμάτων αλλά και στην πληρέστερη κατανόηση και ανάλυση των αποτελεσμάτων τους.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ

Κεντρικός Στόχος της παρούσας εργασίας, αποτέλεσε η ανάπτυξη ενός Μοντέλου Συστημικής Βιολογίας και πιο συγκεκριμένα ενός Δικτύου Βιοχημικών Αντιδράσεων, που θα είναι ικανό να προσομοιώσει τις δυναμικές μεταβολές σε ένα σύστημα υπερ-έκφρασης της WT α-συνουκλείνης σε ντοπαμινεργικούς νευρώνες. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα φάση ανάπτυξης του μοντέλου τέθηκε ο στόχος να προσομοιωθούν τα επίπεδα της ASYN και των διαφόρων ολιγομερών της όπως επίσης η αποδόμησή της από τους κεντρικούς πρωτεολυτικούς μηχανισμούς αλλά και τα προβλήματα που δημιουργεί η υπερ-έκφρασή της σε αυτούς.

Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου, μελετήθηκαν οι βασικές αρχές του χώρου της Συστημικής Βιολογίας (Κεφάλαιο 1), ενώ στη συνέχεια η μελέτη εξειδικεύτηκε στα Δίκτυα Βιοχημικών Αντιδράσεων (Κεφάλαιο 2), δεδομένων των βιοχημικού επιπέδου γνώσεων για το σύστημα. Για την όσο το δυνατόν αποδοτικότερη δημιουργία και κατόπιν προσομοίωση, ανάλυση και εκπαίδευση του Δικτύου, μελετήθηκαν (Κεφάλαιο 2) οι κυρίαρχες μέθοδοι Προσομοίωσης, Ανάλυσης και Εκτίμησης Παραμέτρων Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων.

Όπως είναι αναμενόμενο, η δημιουργία ενός Υπολογιστικού Μοντέλου που αναφέρεται σε ένα Βιολογικό φαινόμενο, απαιτεί εκτός από την μελέτη των υπολογιστικών μεθοδολογιών και την μελέτη του ίδιου του φαινομένου έτσι ώστε να γίνουν οι κατάλληλες επιλογές μοντελοποίησης, που θα συμφωνούν με τα εργαστηριακά ευρήματα, αλλά και να είναι εφικτή η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Για το λόγο αυτό, παρότι μεγάλο μέρος των βιολογικών γνώσεων προήλθε από δημοσιεύσεις του συνεργαζόμενου εργαστηρίου, πραγματοποιήθηκε μία ευρεία αναζήτηση της βιβλιογραφία για τα ζητήματα σχετικά με τη ΝτΠ αλλά κυρίως για τα σχετικά με την ASYN φαινόμενα (Κεφάλαιο 3).

Έχοντας συλλέξει την απαραίτητη γνώση, δημιουργήθηκε η δομή του μοντέλου ενώ στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ο μαθηματικός ορισμός του μοντέλου (Κεφάλαιο 4). Αξιοποιώντας τα διαθέσιμα εργαστηριακά δεδομένα, εκτιμήθηκε ένας μεγάλος αριθμός παραμέτρων του συστήματος.

Παρά τις αρκετές παραδοχές απλούστευσης του μοντέλου, που κρίθηκαν αναγκαίες για αυτή την πρώτη φάση ανάπτυξης του και τα περιορισμένα δεδομένα με τα οποία έγινε η εκπαίδευση, τα αποτελέσματα της Προσομοίωσης του μοντέλου (Κεφάλαιο 5) δείχνουν σημαντικά ικανοποιητική προσομοίωση της συμπεριφοράς του μοντέλου ενώ σε πολλές περιπτώσεις οντοτήτων υπάρχει και αριθμητική σύγκλιση. Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του προκύπτοντος μοντέλου, είναι η δυνατότητά του να πραγματοποιήσει προβλέψεις για την συμπεριφορά του συστήματος σε ενδεχόμενες αλλαγές αυτού και μάλιστα τα τρία σενάρια τροποποιήσεων του συστήματος που δοκιμάστηκαν επέστρεψαν αποτελέσματα τα οποία συμφωνούν με εργαστηριακά ευρήματα. Έτσι, το συγκεκριμένο μοντέλο, μπορούμε να πούμε ότι αποτελεί μία καλή βάση έτσι ώστε οι μέχρι σήμερα παρατηρήσεις, να μοντελοποιηθούν με λεπτομέρεια και ακρίβεια ενώ φαινόμενα τα οποία ακόμα δεν έχουν εισαχθεί, να μπορούν σταδιακά να καλυφθούν.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τους μελλοντικούς στόχους που διαμορφώνονται από τα αποτελέσματα της εργασίας, αυτοί αφορούν αρχικά στην απόκτηση πιο λεπτομερών (όσον αφορά τις οντότητες που περιγράφουν) και πιο πυκνών (όσον αφορά τις στιγμές δειγματοληψίας), δεδομένων, τα οποία σε συνδυασμό με τη χρήση πιο εξεζητημένων μεθόδων Εκτίμησης Παραμέτρων, πιστεύεται ότι θα οδηγήσουν σε ένα μοντέλο που θα προσομοιώνει με ακόμα μεγαλύτερη ακρίβεια τα παρατηρούμενα φαινόμενα, ενώ θα μπορεί με μεγαλύτερη ασφάλεια να πραγματοποιεί προβλέψεις. Επιπροσθέτως, ιδιαίτερα σημαντική κρίνεται η επέκταση του μοντέλου, για να καλύψει κι άλλα φαινόμενα που έχει παρατηρηθεί να σχετίζονται με την υπερ-έκφραση της ASYN (Κεφάλαιο 3). Συγκεκριμένα σχεδιάζεται η προσθήκη του φαινομένου έκκρισης οντοτήτων ASYN από τα κύτταρα κάτι που μπορεί να συνδυαστεί με την επανεκπαίδευση του μοντέλου και να συμβάλει στην ακριβέστερη προσομοίωση των επιπέδων της ASYN. Ακολούθως, ιδιαίτερα σημαντική κρίνεται η μελέτη και κατάλληλη μοντελοποίηση των μηχανισμών κυτταρικών θανάτου, δηλαδή της Απόπτωσης (συμπεριλαμβανομένων των σχετικών με τα μιτοχόνδρια φαινομένων) και του Αυτοφαγικού θανάτου και η προσπάθεια συνδρομής στις σχετικές μελέτες. Δεδομένου τώρα και του κεντρικού ρόλου του Ασβεστίου στην ομοιόσταση των νευρώνων αλλά και της συσχέτισης των επιπέδων του με διάφορα φαινόμενα που εμπλέκουν την ASYN, η μοντελοποίηση σχετικών μηχανισμών κρίνεται και αυτή σημαντική.

Ως τελικός στόχος, ωστόσο, τίθεται η μετάβαση σε ένα πολυεπίπεδο μοντέλο το οποίο θα προσομοιώνει εκτός από τα φαινόμενα που συμβαίνουν εντός του κυττάρου και τα φαινόμενα που συμβαίνουν σε επίπεδο πληθυσμού κυττάρου. Κεντρικό ρόλο σε αυτή την επέκταση, σχεδιάζεται να έχουν τα φαινόμενα της έκκρισης της ASYN αλλά και του κυτταρικού θανάτου, είτε αυτός οφείλεται στην εντός του κυττάρου ASYN είτε αυτός οφείλεται στην εκκρινόμενη από άλλα κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο πιστεύεται ότι θα γίνει εφικτή μία προσομοίωση της επηρεαζόμενης από την ASYN και την υπερ-έκφρασή της συμπεριφοράς ενός πληθυσμού κυττάρων και έτσι να επιχειρηθεί να βοηθηθούν οι σχετικές μελέτες που αφορούν την υπόθεση διάδοσης της παθολογίας της ΝτΠ μεταξύ των κυττάρων [117, 118].

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Aggregates	Συσσωμάτια
Ampipathic	Αμφιπαθές/αμφίφιλο
Amyloid	Αμυλοειδές
Apoptosis	Απόπτωση
Approximate Stochastic	Προσεγγιστικά Στοχαστικοί
Autophagic cell death	Αυτοφαγικός θάνατος
Aytophagosome	Αυτοφαγόσωμα
Biochemical Networks	Δίκτυα Βιοχημικών Αντιδράσεων
Bioinformatics	Βιοπληροφορική
Caspase	Κασπάση
Catecholamine	Κατεχολαμίνη
Cerebrospinal fluid	Εγκεφαλονωτιαίο υγρό
Champerone Mediated Autophagy	Διαμεσολαβούμενη από Σαπερόνες Αυτοφαγία
Chaperone	Σαπερόνη
Chemical Master Equation	Κύρια Χημική Εξίσωση
Chemical species	Χημικές οντότητες
Cognitive	Πνευματικό
Compartment	Διαμέρισμα
Constraint	Περιορισμός
Cytochrome	Κυτόχρωμα
Data Mining	Εξαγωγή Γνώση από Δεδομένα
Definite Orders	Οριστική κατάταξη
Degenerative	Εκφυλιστική
Dopamine	Ντοπαμίνη
Doxycycline	Δοξυκυκλίνη
Dynamic	Δυναμική
Elasticity coefficients / elasticities	Συντελεστές ελαστικότητας
Elementary	Στοιχειώδεις
Event	Γεγονός
Executable	Εκτελέσιμη
Extrinsic Noise	Εξωγενής θόρυβος
Familial	Κληρονομική
Fibrils	Ινίδια
Finite difference	Πεπερασμένες διαφορές
First Reaction Method	Μέθοδος της Πρώτης Αντίδρασης
Flow	Ροή
Flow cytometry	Κυτταρομετρία ροής
Function	Συνάρτηση
Gene regulatory networks	Δίκτυα ρύθμισης γονιδίων
Generic/Generalizes Sensitivities	Γενικές ή Γενικευμένες Ευαισθησίες
Genetics	Γενετική
Genome Annotation	Χαρακτηρισμός Γονιδιώματος
Genome Assembly	Διάταξη Γονιδιώματος
Genome Wide association studies	Μελέτες Συσχέτισης σε κλίμακα Γονιδιώματος

Global Optimization	Ολικής Βελτιστοποίηση
Global Sensitivity Analysis	Ολική Ανάλυση Ευαισθησίας
Human Genome Project	Πρόγραμμα Αποκωδικοποίησης του ανθρωπίνου γονιδιώματος
Immunoblot	Ανοσοαποτύπωμα
Inclusions	Έγκλειστα
Inference	Συμπερασμός
Intact nuclei	Ακέραιοι πυρήνες
Intermolecular	Διαμοριακές
Intrinsic Noise	Εγγενής θόρυβος
Lewy Bodies	Σωματία Lewy
Likelihood	Πιθανοφάνεια
Local Sensitivity Analysis	Τοπική Ανάλυση Ευαισθησίας
Lyapunov exponents	Εκθέτες Lyapunov
Machine Learning	Μηχανική Μάθηση
Macroautophagy	Μακροαυτοφαγία
Mass action	Δράση Μάζας
Metabolic Control Analysis	Ανάλυση Μεταβολικού Ελέγχου
Metabolic networks	Μεταβολικά δίκτυα
Midbrain	Μεσεγκέφαλος
Missense mutations	Παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις
Molar concentrations	Μοριακές συγκεντρώσεις
Multimodal	Πολυτροπικό
Natively unfolded	Εγγενώς μη διπλωμένη
Next Reaction Method	Μέθοδος Επόμενης Αντίδρασης
Nonconvex	Μη-κυρτό
Non-Linear Programming	Μη-Γραμμικός Προγραμματισμός
Nuclein	Νουκλεΐνη
Numerical differentiation	Αριθμητική διαφορίση
Oligomers	Ολιγομερή
Parameter	Παράμετρος
Parameter Estimation	Εκτίμηση Παραμέτρων
Parkinson's Disease	Νόσος του Πάρκινσον
Particle	Σωματίδιο
Pattern Recognition	Αναγνώριση Προτύπων
Positional cloning	Κλωνοποίηση Θέσης
Post-translational modifications	Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις
Process	Διαδικασία
Protein Structure Alignment	Στοίχιση Δομών Πρωτεϊνών
Protein Structure Prediction	Πρόβλεψη Δομών Πρωτεϊνών
Protein-Protein Interaction	Αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνών
Reaction	Αντίδραση
Reaction channels	Κανάλια αντιδράσεων
Reactive Oxygen Species	Ενεργές Οντότητες Οξυγόνου
Receptor	Υποδοχέας
Recombinant	Ανασυνδυασμένη
Regulatory networks	Ρυθμιστικά δίκτυα
Relationship	Σχέση
Response Coefficients	Συντελεστές Αντίδρασης
Retinoic Acid	Ρετινοϊκό Οξύ

Reversible	Αντιστρέψιμες
Robustness	Ευρωστία
Rule	Κανόνας
Scaled	Κλιμακωτά
Sensitivity Analysis	Ανάλυσης Ευαισθησίας
Sequence Alignment	Στοίχιση ακολουθιών
Signaling pathways	Βιολογικά μονοπάτια σηματοδότησης
Sporadic	Σποραδικό
Steady-state	Σταθερή κατάσταση
Stochastic Differential Equation	Στοχαστική Διαφορική Εξίσωση
Stochastic Simulation Algorithm Direct Method	Αλγόριθμος Στοχαστικής Προσομοίωσης Ευθείας Μεθόδου
Stoichiometric coefficients	Στοιχειομετρικοί συντελεστές
Sub-cellular	Υπο-κυττάριο
Substansia Nigra	Μέλαινα Ουσία
Synaptic vesicles	Συναπτικά κυστίδια
Systems Biology	Συστημική Βιολογία
Time Scale Separation	Μέθοδος Διαχωρισμού μέσω Κλίμακας Χρόνου
Time-series	Χρονοσειρές
Transmembrane potential	Διαμεμβρανική τάση
Trial and error	Δοκιμή και απόρριψη
Tyrosine Hydroxylase	Τυροσίνη Υδροξυλάση
Ubiquitin-Proteasome System	Σύστημα Ουμπικουιτίνης-Πρωτεασώματος
Unit	Μονάδα
Visualization	Οπτικοποίηση
Well-stirred	Ομοιογενές

ΣΥΝΤΗΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AMPT	α -methyl-p-tyrosine
ASYN	alpha-synuclein / α -συνουκλεΐνη
CMA	Champerone Mediated Autophagy
CME	Chemical Master Equation
CSF	Cerebrospinal fluid
DA	Dopamine
Dox	Doxycycline
EC	Evolutionary Computation
EP	Evolutionary Programming
FDA	Food and Drug Administration
GA	Genetic Algorithm
GASR	Genetic Algorithm with Stochastic Ranking
GO	Global Optimization
kDa	kilo Dalton
MCA	Metabolic Control Analysis
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
ML	Maximum Likelihood
NLP	Non-Linear Programming
ODE	Ordinary Differential Equation
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD	Parkinson's Disease
PS	Particle Swarm
RA	Retinoic Acid
RMS	Root Mean Square
RNAi	RNA interference
ROS	Reactive Oxygen Species
SA	Simulated Annealing
SBGN	Systems Biology Graphical Notation
SBML	Systems Biology Markup Language
SDE	Stochastic Differential Equation
SRES	Evolutionary Strategy

SSA	Stochastic Simulation Algorithm
TH	Tyrosine Hydroxylase
Thio-T	Thioflavin
UPS	Ubiquitin-Proteasome System
IIBEAA	Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών
ΚΝΣ	Κεντρικό Νευρικό Σύστημα
ΝτΠ	Νόσος του Πάρκινσον

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Βιβλιογραφική Ανασκόπηση των εναλλακτικών μεθόδων Εκτίμησης Παραμέτρων

Εκτίμηση Παραμέτρων μέσω Μεγιστοποίησης της Πιθανοφάνειας

Οι μέθοδοι που βασίζονται στην Μεγιστοποίηση της Πιθανοφάνειας (Maximum Likelihood-ML) αποτελούν συνδετικό κρίκο μεταξύ των μεθόδων Μηχανικής Μάθησης και των μεθόδων Βελτιστοποίησης μιας και εντός των διαδικασιών τους χρησιμοποιούν αλγορίθμους βελτιστοποίησης για την εύρεση των τιμών των παραμέτρων που μεγιστοποιούν τη Likelihood. Ωστόσο σημαντική διαφορά αποτελεί το γεγονός ότι με αυτές τις μεθόδους μπορούμε να εκτιμήσουμε παραμέτρους μοντέλων που έχουν μοντελοποιηθεί και σε Στοχαστικό Πλαίσιο.

Στην εργασία «*Simulated maximum likelihood method for estimating kinetic rates in gene expression*» [66] προτείνεται η χρήση της μεθόδου Simulated Maximum Likelihood για την εκτίμηση παραμέτρων (δηλαδή η χρήση δεδομένων από προσομοιώσεις για τον υπολογισμό της likelihood των διαθέσιμων δεδομένων) ενώ δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα στο ζήτημα της εκτίμησης παραμέτρων Συστημάτων που χρήζουν Στοχαστικής Μοντελοποίησης-Προσομοίωσης. Στην συγκεκριμένη εργασία Χρησιμοποιούνται τρεις διαφορετικοί τρόποι μοντελοποίησης των υπό δοκιμή συστημάτων για να καταδειχθεί η καταλληλότητά τους, στα πλαίσια της εκτίμησης παραμέτρων, ανάλογα με την φύση του Συστήματος και κυρίως την τάξη του αριθμού μορίων που εμφανίζονται σε αυτό. Οι τρόποι αυτοί είναι:

- Μέσω ODEs (Ντετερμινιστικά)

$$\frac{dx_i}{dt} = f_i(x) - g_i(x)$$

Εξίσωση 6.1

- Μέσω Στοχαστικών Μοντέλων που βασίζονται σε μακροσκοπικές διακριτές αντιδράσεις (discrete biochemical reactions-DBR)

$$x_i(t + \tau) = x_i(t) + P[f_i(x)\tau] - P[g_i(x)\tau]$$

Εξίσωση 6.2

όπου οι διαδικασίες αύξησης και μείωσης του Ντετερμινιστικού μοντέλου έχουν αντικατασταθεί από τυχαίες μεταβλητές Poisson.

- Μέσω Στοχαστικών Διαφορικών Εξισώσεων (Stochastic Differential Equations/SDEs)

Οι δύο τελευταίες προτεινόμενες μέθοδοι βασίζονται στον υπολογισμό της από κοινού πυκνότητας πιθανότητας μετάβασης (joint transitional density/JTD), δηλαδή της likelihood, των δεδομένων παρατήρησης του συστήματος σε $N+1$ ($\{x_0, x_1, \dots, x_N\}$) χρονικές στιγμές ($\{t_0, t_1, \dots, t_N\}$).

Η Πυκνότητα Πιθανότητας Μετάβασης (transitional density/TD) ορίζεται ως

$$f((t_i, x_i)|(t_{i-1}, x_{i-1}), \dots, (t_0, x_0); \theta)$$

Ορισμός 6.1

ωστόσο επειδή η στοχαστική διαδικασία $\mathbf{x}$ (δηλαδή οι διαδοχικές αλλαγές στην κατάσταση του συστήματος λόγω των πραγματοποιήσεων αντιδράσεων) είναι διαδικασία Markov (Markov Process) [119] η TD γίνεται:

$$f[(t_i, x_i)|(t_{i-1}, x_{i-1}); \theta]$$

Ορισμός 6.2

και έτσι η log-likelihood υπολογίζεται ως εξής:

$$L(\theta) = -\log(f_0[t_0, x_0]|\theta) - \sum_{i=1}^N \log(f[(t_i, x_i)|(t_{i-1}, x_{i-1}); \theta])$$

Εξίσωση 6.3

Επειδή η TD δεν μπορεί πάντα να δοθεί σε κλειστή μορφή προτείνονται δύο διαφορετικές μέθοδοι για την εκτίμηση της TD ανάλογα με την μέθοδο μοντελοποίησης και έτσι έχουμε τις παρακάτω μεθόδους εκτίμησης Παραμέτρων:

Μέθοδος 1(Μοντελοποίηση μέσω SDEs):

1. Εισαγωγή των μετρήσεων $\{x_0, \dots, x_N\}$ για τις χρ.στιγμές $\{t_0, \dots, t_N\}$
2. Δημιουργία M πραγματοποιήσεων $y_1, \dots, y_M$ του $\mathbf{x}$ για την χρ.στιγμή t_i , έχοντας ως αρχική κατάσταση την x_{i-1} για την χρ.στιγμή t_{i-1} και χρησιμοποιώντας **αριθμητική μέθοδο**.
3. Εκτίμηση της TD με χρήση της μη παραμετρικής πυκνότητας $\bar{f}_M[(t, x)|(t_{i-1}, x_{i-1}); \theta] = \frac{1}{MB} \sum_{j=1}^M K\left(\frac{x-y_j}{B}\right)$, με χρήση κανονικού πυρήνα ή συν.πυκνότητας πολλών μεταβλητών.
4. Επανάληψη των βημάτων 2 και 3 για κάθε χρ.στιγμή $t_0, \dots, t_{N-1}$ και χρήση των αποτελεσμάτων για την σύνθεση της $L(\theta)$
5. Εύρεση των βέλτιστων παραμέτρων μέσω GA ελαχιστοποιώντας την $L(\theta)$.

Μέθοδος 2(Μοντελοποίηση μέσω DBRs):

1. Εισαγωγή των μετρήσεων $\{x_0, \dots, x_N\}$ για τις χρ.στιγμές $\{t_0, \dots, t_N\}$
2. Δημιουργία M πραγματοποιήσεων $y_1, \dots, y_M$ του $\mathbf{x}$ για την χρ.στιγμή t_i , έχοντας ως αρχική κατάσταση την x_{i-1} για την χρ.στιγμή t_{i-1} και χρησιμοποιώντας **Στοχαστική Προσομοίωση**.

3. Εκτίμηση της TD με χρήση της κατανομής συχνότητας των προσομοιωμένων αριθμών μορίων. Για την περίπτωση συστημάτων με μία μεταβλητή είναι: $F[x(t_i) = m] = \frac{1}{M} \sum_{j=1}^M [1 - \delta(m - y_i)]$ με $m = 0, 1, \dots$. Επίσης αν το σύστημα παρουσιάζει ταυτόχρονα και μικρούς και μεγάλους αριθμούς μορίων, προτείνεται η αντικατάσταση της δ με την $\delta_w(m - y_i) = \begin{cases} 0 & \text{αν } w_{ij}|m - y_i| < 1 \\ 1 & \text{αλλιώς} \end{cases}$, όπου $w_{ij} = 1/(x_i \varepsilon)$
4. Επανάληψη των βημάτων 2 και 3 για κάθε χρονική στιγμή $t_0, \dots, t_{N-1}$ και χρήση των αποτελεσμάτων για την σύνθεση της $L(\theta)$
5. Εύρεση των βέλτιστων παραμέτρων μέσω GA ελαχιστοποιώντας την $L(\theta)$.

Θα πρέπει τέλος να σημειωθεί ότι για όλα τα μοντέλα στα οποία δοκιμάστηκαν-συγκρίθηκαν οι παραπάνω τρεις κατηγορίες μεθόδων (που αφορούσαν διαδικασίες έκφρασης γονιδίων και είχαν μονοψήφιο αριθμό αντιδράσεων και οντοτήτων) η μέθοδος μέσω DBRs επέστρεψε τα καλύτερα αποτελέσματα.

Συνεχίζοντας, η εργασία «*Global parameter estimation methods for stochastic biochemical systems*» [120] ασχολείται αποκλειστικά με την δημιουργία μεθόδων κατάλληλων για συστήματα που προσομοιώνονται Στοχαστικά και παρουσιάζουν μικρούς αριθμούς οντοτήτων. Σημαντικό χαρακτηριστικό της εργασίας είναι ότι αφορά σε συστήματα που Μοντελοποιούνται βάσει της Chemical Master Equation (CME) της οποίας Ακριβής Προσομοιωτής(exact simulator) είναι ο αλγόριθμος SSA(Gillespie), ο οποίος χρησιμοποιείται και για την παραγωγή των δεδομένων και για την εκτίμηση της PDF του μοντέλου CME (Εξίσωση 2.14). Ωστόσο, οι προτεινόμενες μέθοδοι μπορούν να εφαρμοστούν και σε άλλες μορφές Στοχαστικής Μοντελοποίησης αρκεί η συμπεριφορά του συστήματος να περιγράφεται από τις PDF των καταστάσεων.

Στην εργασία προτείνονται και συγκρίνονται τρεις μέθοδοι. Και οι τρεις προσπαθούν να ελαχιστοποιήσουν την απόσταση μεταξύ των προβλέψεων του μοντέλου και των εργαστηριακών δεδομένων. Επιπροσθέτως θεωρείται ότι υπάρχει θόρυβος μετρήσεων (λευκός Gaussian θόρυβος $N(0, \sigma^2)$) ο οποίος προστίθεται στα εργαστηριακά δεδομένα (τα οποία στην συγκεκριμένη περίπτωση έχουν προκύψει από προσομοιώσεις).

Μέθοδος 1: Maximum Likelihood

- Θεωρούμε ότι διαθέτουμε δεδομένα από j πειράματα για n χρονικές στιγμές: $\{o_1^j, o_2^j, \dots, o_n^j\}$
- Η likelihood δίνεται από την:
-

$$L(\theta) = \prod_{j=1}^m \prod_{i=1}^n f(o_i^j, t_i; \theta)$$

Εξίσωση 6.4

και έτσι η εκτίμηση παραμέτρων επιτυγχάνεται μεγιστοποιώντας τη likelihood ως εξής:

$$\theta^* = \arg \max_{\theta} L(\theta) = \arg \max_{\theta} \prod_{j=1}^m \prod_{i=1}^n f(o_i^j, t_i; k) = \arg \max_{\theta} \prod_{j=1}^m \prod_{i=1}^n P(o_i^j, t_i | x_0, t_0)$$

Εξίσωση 6.5

ή ισοδύναμα

$$\theta^* = \arg \min_{\theta} -\log L(\theta)$$

Εξίσωση 6.6

ενώ, η PDF των καταστάσεων $P(o, t_i | x_0, t_0)$ (στο εξής $P(o, t_i)$) ανασυντίθεται μέσω προσομοιώσεων του SSA και ιστογραμμάτων. Στα αποτελέσματα των προσομοιώσεων, x , προσθέτουμε αν χρειάζεται λευκό Gaussian θόρυβο e ώστε $o = x + e$ και κατόπιν στρογγυλοποιούμε στον εγγύτερο ακέραιο

Μέθοδος 2: Density Distance Function

- Παρόμοιας λογικής με Kullback-Leibler distance και έτσι οι παράμετροι υπολογίζονται βάσει της

$$\theta^* = \arg \min_{\theta} \sum_{i=1}^n \sum_{l=1}^{L-1} \frac{(P_e(o_l, t_i) - P(o_l, t_i))^2}{s_{l,i}^2}$$

Εξίσωση 6.7

όπου:

- $P_e(o_l, t_i)$: PDF ανασυντεθειμένη από τα εργ.δεδομένα με χρήση ιστογράμματος L κάδων όπου o_l το μέσο του κάθε κάδου
- $P(o_l, t_i)$: Παρομοίως για τις προσομοιώσεις SSA
- $s_{l,i}^2$: Παράγοντας Βάρους που αποτελεί εκτίμηση της διακύμανσης της πιθανότητας του l -οστού κάδου τη στιγμή t_i . Επειδή η διαδικασία ταξινόμησης N στοιχείων σε κάδους μπορεί να οριστεί ως διωνυμική(binomial) διαδικασία έχουμε :

$$s_{l,i}^2 = \frac{P_e(o_l, t_i)(1 - P_e(o_l, t_i))}{N}$$

Εξίσωση 6.8

Τέλος, όπως σημειώνεται στην σχετική εργασία, η συγκεκριμένη μέθοδος απαιτεί αρκετά μεγάλο αριθμό εργ. Δεδομένων για την εκτίμηση της PDF(σε αντίθεση με την ML)

Μέθοδος 3: Cumulative density function Distance

- Μέσω της συγκεκριμένης μεθόδου επιχειρείται η ελαχιστοποίηση της διαφοράς μεταξύ της ανασυντεθειμένης CDF από τα εργαστηριακά δεδομένα και της CDF από προσομοιώσεις SSA και έτσι η εκτίμηση παραμέτρων γίνεται μέσω της

$$\theta^* = \arg \min_{\theta} \sum_{i=1}^n \sum_{l=1}^{L-1} \frac{(F_e(o_l, t_i) - F(o_l, t_i))^2}{S_{l,i}^2}$$

Εξίσωση 6.9

όπου

- $F_e(o_l, t_i)$: PDF ανασυντεθειμένη από τα εργαστηριακά δεδομένα με χρήση ιστογράμματος L κάδων όπου o_l το μέσο του κάθε κάδου
- $F(o_l, t_i)$: Παρομοίως για τις προσομοιώσεις SSA και έτσι

$$S_{l,i}^2 = \frac{F_e(o_l, t_i)(1 - F_e(o_l, t_i))}{N}$$

Εξίσωση 6.10

Τέλος, όπως συμπεραίνεται στην σχετική εργασία, επειδή η CDF είναι λιγότερο ευαίσθητη στον θόρυβο λόγω πεπερασμένης δειγματοληψίας μπορεί να εφαρμοστεί και για μικρό αριθμό εργαστηριακών δεδομένων.

Για την εύρεση των παραμέτρων, ελαχιστοποιώντας τις κατά περίπτωση συναρτήσεις που παρουσιάστηκαν παραπάνω, στην συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιείται η μέθοδος Βελτιστοποίησης Differential Evolution [121] η οποία είναι παρόμοια σε φιλοσοφία με τον αλγόριθμο GA.

Στα τελικά συμπεράσματα της εργασίας, που εξάγονται μέσω της εκτίμησης παραμέτρων σε δύο Δίκτυα (3 και 15 παραμέτρων αντιστοίχως), επισημαίνεται ότι η καλύτερη απόδοση επιτυγχάνεται με τη χρήση της 3^{ης} μεθόδου.

Ως τελευταία αντιπροσωπευτική εργασία του συγκεκριμένου χώρου επιλέχθηκε να παρουσιαστεί η «*Parameter Estimation of Kinetic Rates in Stochastic Reaction Networks by the EM Method*» [122] η οποία αναφέρεται ως η πρώτη εφαρμογή του αλγορίθμου Expectation Maximization (EM) [123] στην Εκτίμηση Παραμέτρων και αφορά σε συστήματα που μοντελοποιούνται Στοχαστικά (βάσει της θεωρίας του Gillespie).

Στη συγκεκριμένη εργασία, Θεωρούμε τρεις τυχαίες μεταβλητές X (πλήρη δεδομένα), Y (γνωστά δεδομένα-εργαστηριακά) και Z (τα άγνωστα δεδομένα-οι καταστάσεις στις ενδιαμέσες στιγμές μεταξύ των στιγμών για τις οποίες διαθέτουμε εργαστηριακές

μετρήσεις) και αντίστοιχα x, y, z οι τιμές τους όπου γνωρίζουμε μόνο την y . Ακολουθώντας, στα πλαίσια της λογικής του EM αλγορίθμου, ορίζονται τα δύο παρακάτω βήματα:

- **E-Step:** Ανακατασκευή των πλήρων δεδομένων, x , βάσει των γνωστών δεδομένων y και των παραμέτρων θ . μέσω της

$$z' = E[Z|Y = y, \theta]$$

Εξίσωση 6.11

και έτσι δημιουργούνται τα αναμενόμενα πλήρη δεδομένα μέσω της συνένωσης y και x' .

- **M-Step:** Εύρεση κατάλληλου συνόλου παραμέτρων θ' έτσι ώστε η likelihood των πλήρων δεδομένων x' να μεγιστοποιείται.

Για την πληρέστερη περιγραφή της προτεινόμενης προσέγγισης για το πρόβλημα της εκτίμησης παραμέτρων, μπορούν να δοθούν κάποιες επιπλέον λεπτομέρειες για την διαδικασία που ακολουθείται.

- **Αρχικές τιμές παραμέτρων:** Χρησιμοποιείται Ντετερμινιστικό μοντέλο (ODEs) ώστε να εκτιμηθεί το διάνυσμα αρχικών παραμέτρων $\overline{\theta}_0$ χρησιμοποιώντας κλασσικές μεθόδους βελτιστοποίησης
- **E-Step:** Δεχόμενοι ότι το διάνυσμα των παραμέτρων έχει τιμές $\overline{\theta}_k$, δημιουργούμε (συμπληρώνουμε) την ακολουθία αντιδράσεων έτσι ώστε τις στιγμές t_i (διαθέτουμε εργαστηριακά δεδομένα) το σύστημα να βρίσκεται στην κατάσταση Y_i και στις υπόλοιπες στιγμές να έχει την συμπεριφορά που ορίζουν οι παράμετροι $\overline{\theta}_k$.
 - ο **Λόγω της πολυπλοκότητας του SSA, για την επιτάχυνση της όλης διαδικασίας, χρησιμοποιείται η μέθοδος Monte Carlo EM** (πλέον δεν είναι εξασφαλισμένη η συνεχής αύξηση της likelihood ωστόσο το μέγιστο προσεγγίζεται με μεγάλη πιθανότητα).

Για την συμπλήρωση της ακολουθίας αντιδράσεων για το χρονικό διάστημα t_i μέχρι t_{i+1} έχουμε:

- ο **1° Βήμα:** Πραγματοποίηση M_s προσομοιώσεων με αρχική κατάσταση Y_i για χρόνο $t_{i+1} - t_i$ και επιλέγουμε εκείνη για την οποία η απόσταση από την Y_{i+1} η ελάχιστη (sum of relative errors).
- ο **2° Βήμα:** Για την αποφυγή μεγάλου αριθμού προσομοιώσεων, προτείνεται η εκτέλεση μικρού αριθμού προσομοιώσεων και εν συνεχεία η **βελτίωση** της καλύτερης προσομοίωσης βάσει της παρακάτω διαδικασίας:

- Έστω ότι καταλήγουμε στην ακολουθία αντιδράσεων $Y_i = Z_0 \xrightarrow{r_1, s_1} Z_1 \dots \xrightarrow{r_L, s_L} Z_L$, όπου r_i η αντίδραση που

πραγματοποιήθηκε και s_i το ενδιάμεσο χρονικό διάστημα μεταξύ των αντιδράσεων και ισχύει $\sum_{j=1}^L s_j \leq t_{i+1} - t_i < \sum_{j=1}^{L+1} s_j$.

- Επιλέγουμε το ποσοστό των αντιδράσεων που θα τροποποιήσουμε $0 < M_i < 1$
- Επαναλαμβάνουμε $[M_i L]$ φορές:
 - Επιλέγουμε τυχαία μία αντίδραση
 - Ελέγχουμε αν αυτή η αντίδραση μπορεί να αντικατασταθεί από μία άλλη με τέτοιο τρόπο ώστε οι επόμενες αντιδράσεις να μπορούν να πραγματοποιηθούν και η τελική κατάσταση να είναι πιο κοντά στην κατάσταση Y_{i+1} (δηλαδή δεν τροποποιείται η υπόλοιπη σειρά των αντιδράσεων αλλά μόνο οι ενδιάμεσες καταστάσεις). **Οι λεπτομέρειες της συγκεκριμένης μεθόδου δεν δίνονται με λεπτομέρεια στην εργασία.**

Για παράδειγμα η αντικατάσταση της r_i αντίδρασης παραλλάσει ως εξής την ακολουθία

$$Y_i = Z_0 \xrightarrow{r_1, s_1} Z_1 \dots \xrightarrow{r_{l-1}, s_{l-1}} Z_{l-1} \xrightarrow{r'_l, s_l} Z'_l \xrightarrow{r_{l+1}, s_{l+1}} Z'_{l+1} \xrightarrow{r_L, s_L} Z'_L$$

- Όπως αναφέρεται, η τροποποίηση αυτή δεν επηρεάζει σημαντικά τη likelihood αν ο αριθμός των μορίων των οντοτήτων δεν είναι πολύ κοντά στο 0.
- **M-Step:** Σε αυτό το βήμα της μεθόδου, αναζητούμε νέες τιμές για τις παραμέτρους θ_{k+1} έτσι ώστε η likelihood των ακολουθιών που παρήχθησαν στο E-Step να μεγιστοποιείται.

Αν οι ακολουθίες δίνονται ως εξής:

$$Z_{i,0} = Y_i \xrightarrow{r_{i,1}, s_{i,1}} Z_{i,1} \xrightarrow{r_{i,2}, s_{i,2}} \dots \xrightarrow{r_{i,L_i}, s_{i,L_i}} Z_{i,L_i}$$

τότε η likelihood των ακολουθιών δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\prod_{i=1}^{N-1} \left(\prod_{l=0}^{L_i-1} \underbrace{p(Z_{i,l}, r_{i,l+1}, \theta_{k+1})}_{\text{Πιθανότητα η επόμενη αντίδραση να είναι αυτή που δίνεται στις ακολουθίες}} \underbrace{\lambda(Z_{i,l}, \theta_{k+1})}_{\text{Πυκνότητα πιθανότητας η αντίδραση να πραγματοποιηθεί τη χρονική στιγμή που προβλέπεται στην ακολουθία}} \underbrace{\exp(-\lambda(Z_{i,l}, \theta_{k+1}) s_{i,l+1})}_{\text{Πιθανότητα να μην πραγματοποιείται άλλη αντίδραση μεταξύ του τελευταίου γεγονότος της ακολουθίας και της χρονικής στιγμής } t_{i+1}} \exp(-\lambda(Z_{i,L_i}, \theta_{k+1}) (t_{i+1} - \sum_{j=1}^{L_i} s_{i,j})) \right)$$

Ορισμός 6.3

Εκτίμηση Παραμέτρων μέσω Μεθόδων Αυτομάτου Ελέγχου

Οι κυριότερες προτάσεις στην Εκτίμηση Παραμέτρων Μεθόδων Αυτομάτου Ελέγχου, αφορούν σε εργασίες που αξιοποιούν το Kalman Filter του οποίου το απαραίτητο θεωρητικό υπόβαθρο παρουσιάζεται ακολούθως.

Βασικά στοιχεία του Kalman Filter αποτελούν:

- Οι καταστάσεις του συστήματος στις διάφορες χρονικές στιγμές x_t (εδώ τα επίπεδα των οντοτήτων). Οι μεταβλητές αυτές αποτελούν κρυφές μεταβλητές.
- Οι διαθέσιμες μετρήσεις για το σύστημα z_t (εδώ οι εργαστηριακές μετρήσεις για κάποιες από τις οντότητες του συστήματος ή συνδυασμούς αυτών)
- Οι κινήσεις ελέγχου του συστήματος u_t (εδώ, κατά περιπτώσεις, τα επίπεδα κάποιας οντότητας του συστήματος)
- **Η κατανομή μεταβάσεων κατάστασης (state transition probability)** $p(x_t|x_{t-1}, u_t)$ η οποία προκύπτει από την $p(x_t|x_{0:t-1}, z_{1:t-1}, u_{1:t})$ δεδομένης της παραδοχής Markov (ή αλλιώς της παραδοχής πλήρους κατάστασης) κατά την οποία τα παρελθόντα και τα μέλλοντα δεδομένα είναι ανεξάρτητα δεδομένης της τωρινής κατάστασης x_t και η x_{t-1} θεωρείται επαρκής για να περιγράψει όλες τις προηγούμενες μετρήσεις και κινήσεις ελέγχου. Η παραδοχή αυτή ισχύει και για τα συστήματα που μας ενδιαφέρουν.
- Η κατανομή μετρήσεων $p(z_t|x_t)$
- Οι δυο παραπάνω κατανομές αποτελούν ένα Hidden Markov Model όπου:
 - Η κατάσταση σε χρόνο t εξαρτάται στοχαστικά από την κατάσταση σε χρόνο $t-1$ και από την κίνηση ελέγχου u_t
 - Η μέτρηση z_t εξαρτάται στοχαστικά από την κατάσταση η χρονική στιγμή t
- Κεντρικό ρόλο στο Kalman Filter παίζει η έννοια της Πεποίθησης (belief) που περιγράφει την διαθέσιμη γνώση σχετικά με την κατάσταση του συστήματος με τις δύο παρακάτω μορφές:
 - **Πρόβλεψη (prediction):** $\overline{bel}(x_t) = p(x_t|z_{1:t-1}, u_{1:t})$
 - **Διόρθωση ή Ενημέρωση μέσω μέτρησης:** $bel(x_t) = p(x_t|z_{1:t}, u_{1:t})$
- Βάση για το Kalman Filter αποτελεί το Bayes Filter :

```

1:   Algorithm Bayes_filter( $bel(x_{t-1}), u_t, z_t$ ):
2:     for all  $x_t$  do
3:        $\bar{bel}(x_t) = \int p(x_t | u_t, x_{t-1}) bel(x_{t-1}) dx$ 
4:        $bel(x_t) = \eta p(z_t | x_t) \bar{bel}(x_t)$ 
5:     endfor
6:     return  $bel(x_t)$ 

```

Έχοντας ορίσει τα παραπάνω, μπορεί να δοθεί η πλήρης περιγραφή του Kalman Filter. Το Kalman Filter, λοιπόν, αποτελεί έναν επαναληπτικό εκτιμητή καταστάσεων και ανήκει στην κατηγορία των Gaussian Filters [124]. Ουσιαστικά αποτελεί την εφαρμογή του Bayes Filter σε συνεχείς χώρους, παριστάνοντας τις πεποιθήσεις μέσω Gaussian Κατανομών πολλών μεταβλητών. Συγκεκριμένα, σε χρόνο t , η πεποίθηση περιγράφεται μέσω της μέσης τιμής μ_t και του πίνακα διασποράς Σ_t .

Επιπροσθέτως, για να παραμένουν οι posterior πεποιθήσεις-κατανομές Gaussian σε κάθε χρονική στιγμή, επιπρόσθετα της Markov Παραδοχής θα πρέπει να ισχύουν τα ακόλουθα:

1. $x_t = A_t x_{t-1} + B_t u_t + e_t$. Δηλαδή η πιθανότητα της επόμενης κατάστασης $p(x_t | u_t, x_{t-1})$ να είναι μία γραμμική συνάρτηση ως προς τα ορίσματά της και με προσθήκη Gaussian θορύβου (μηδενικής μέσης τιμής και πίν. Συνδιασποράς R_t). (x_t, u_t διανύσματα) και έτσι:

$$p(x_t | u_t, x_{t-1}) = \det(2\pi R_t)^{-\frac{1}{2}} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (x_t - A_t x_{t-1} - B_t u_t)^T R_t^{-1} (x_t - A_t x_{t-1} - B_t u_t) \right\}$$

2. $z_t = C_t x_t + d_t$. Παρομοίως, η πιθανότητα μετρήσεων $p(z_t | x_t)$ θα πρέπει να είναι γραμμική ως προς τα ορίσματα της με την προσθήκη Gaussian θορύβου (μηδενικής μέσης τιμής και πίν. Συνδιασποράς Q_t).; Έτσι:

$$p(z_t | x_t) = \det(2\pi Q_t)^{-\frac{1}{2}} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (z_t - C_t x_t)^T Q_t^{-1} (z_t - C_t x_t) \right\}$$

3. Η πεποίθηση για την αρχική κατάσταση θα πρέπει να ακολουθεί κανονική κατανομή,

$$bel(x_0) = p(x_0) = \det(2\pi \Sigma_0)^{-\frac{1}{2}} \exp \left\{ -\frac{1}{2} (x_0 - \mu_0)^T \Sigma_0^{-1} (x_0 - \mu_0) \right\}$$

Βάσει των παραπάνω, ο αλγόριθμος του Kalman Filter έχει ως εξής:

```

1: Algorithm Kalman_filter( $\mu_{t-1}, \Sigma_{t-1}, u_t, z_t$ ):
2:    $\bar{\mu}_t = A_t \mu_{t-1} + B_t u_t$ 
3:    $\bar{\Sigma}_t = A_t \Sigma_{t-1} A_t^T + R_t$ 
4:    $K_t = \bar{\Sigma}_t C_t^T (C_t \bar{\Sigma}_t C_t^T + Q_t)^{-1}$ 
5:    $\mu_t = \bar{\mu}_t + K_t (z_t - C_t \bar{\mu}_t)$ 
6:    $\Sigma_t = (I - K_t C_t) \bar{\Sigma}_t$ 
7:   return  $\mu_t, \Sigma_t$ 

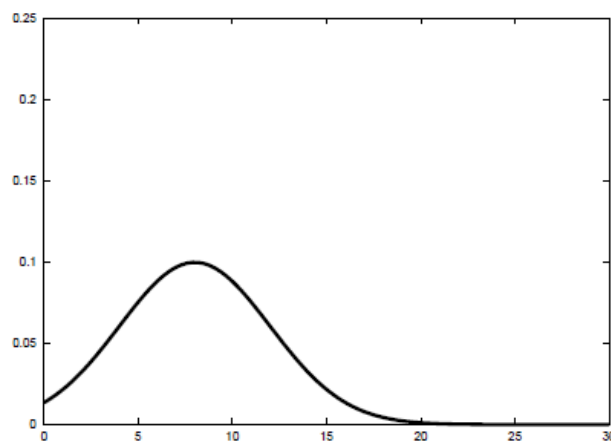
```

όπου:

- $\bar{\mu}_t, \bar{\Sigma}_t$: Πρόβλεψη της μέσης τιμής και της Συνδιασποράς της Gaussian. Αναπαράσταση μέσω αυτών της $\overline{bel}(x_t)$.
- K_t : Κέρδος Kalman (Kalman gain). Καθορίζει το βαθμό που η νέα μέτρηση θα επηρεάσει την τελική εκτίμηση της νέας κατάστασης.
- μ_t, Σ_t : Τελικές εκτιμήσεις και αναπαράσταση της $bel(x_t)$

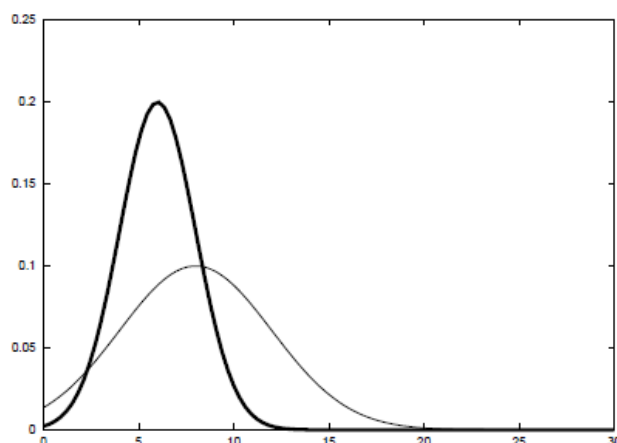
Όσα παρουσιάστηκαν παραπάνω, μπορούν να γίνουν ευκολότερα αντιληπτά, δίνοντας ένα παράδειγμα εκτέλεσης του Kalman Filter, κάτι που γίνεται μέσω των παρακάτω σχημάτων

Αρχική Πεποίθηση



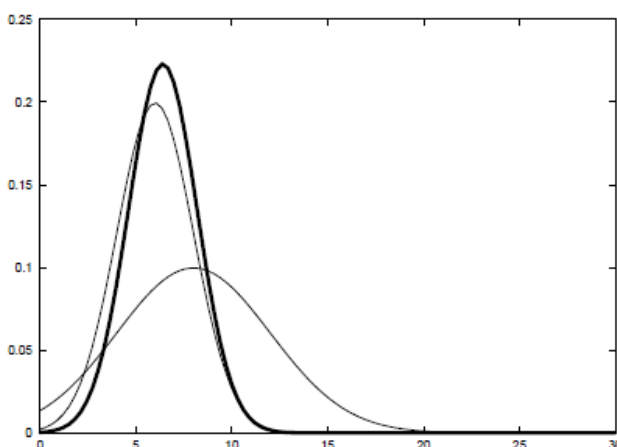
Σχήμα Παραρτ. Ι. 1 Παράδειγμα Αρχικής Πεποίθησης σε Kalman Filter

Μέτρηση (με αβεβαιότητα)



Σχήμα Παραρτ. Ι. 2 Παράδειγμα Μέτρησης (με αβεβαιότητα) σε Kalman Filter

Τελική Πεποίθηση μέσω KF



Σχήμα Παραρτ. Ι. 3 Παράδειγμα Τελικής Πεποίθησης σε Kalman Filter

Συνεχίζοντας, δυστυχώς η των γραμμικών μεταβάσεων κατάστασης και γραμμικών μετρήσεων με προσθήκη Gaussian θορύβου πολύ σπάνια απαντάται στην πράξη. Σε αυτή την περίπτωση το Kalman Filter όπως ορίστηκε προηγουμένως δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Για την αντιμετώπιση του συγκεκριμένου προβλήματος έχουν προταθεί δύο νέοι τύποι Kalman Filter, το Extended Kalman Filter (EKF) και το Unscented Kalman Filter (UKF). Και για τους δύο τύπους ισχύει ότι:

- Οι πιθανότητες καταστάσεων και μετρήσεων καθορίζονται από μη γραμμικές συναρτήσεις g και h ως εξής:

$$\begin{aligned}x_t &= g(u_t, x_{t-1}) + \varepsilon_t \\z_t &= h(x_t) + \delta_t\end{aligned}$$

Εξίσωση 6.12

όπου:

- Η συνάρτηση g αντικαθιστά τους πίνακες A_t και B_t
- Η συνάρτηση h αντικαθιστά τον πίνακα C_t

Ωστόσο, στη γενική περίπτωση, μέσω των παραπάνω οι πεποιθήσεις δεν ακολουθούν Gaussian κατανομή. Έτσι οι επεκτάσεις του KF υπολογίζουν μία προσέγγιση της πεποιθήσης αναπαριστώντας την μέσω μιας Gaussian κατανομής. Ακολουθώς δίνεται ο τρόπος που οι δύο τύποι πραγματοποιούν αυτή την προσέγγιση, ενώ δίνονται και οι λεπτομέρειες υλοποίησης αυτών.

Extended Kalman Filter

Σε αυτόν τον τύπο KF ακολουθείται η τεχνική γραμμικοποίησης (linearization) μέσω επέκτασης Taylor (Taylor Expansion) [125] για την προσέγγιση των μη γραμμικών συναρτήσεων g και η h . Η γραμμική προσέγγιση δημιουργείται μέσω των τιμών των συναρτήσεων και των κλίσεων τους που υπολογίζονται ως εξής:

$$g'(u_t, x_{t-1}) := \frac{\partial g(u_t, x_{t-1})}{\partial x_{t-1}}$$

Η τιμή των g και h αλλά και των κλίσεων τους εξαρτάται από τα ορίσματά τους. Για την g επιλέγεται το πλέον πιθανό όρισμα την στιγμή της γραμμικοποίησης που είναι η μ_{t-1} και παρομοίως για την h επιλέγεται το $\bar{\mu}_t$.

Βάσει των παραπάνω δομείται ο αλγόριθμος του EKF ο οποίος στα βασικά του χαρακτηριστικά δεν διαφέρει από αυτόν του KF.

```

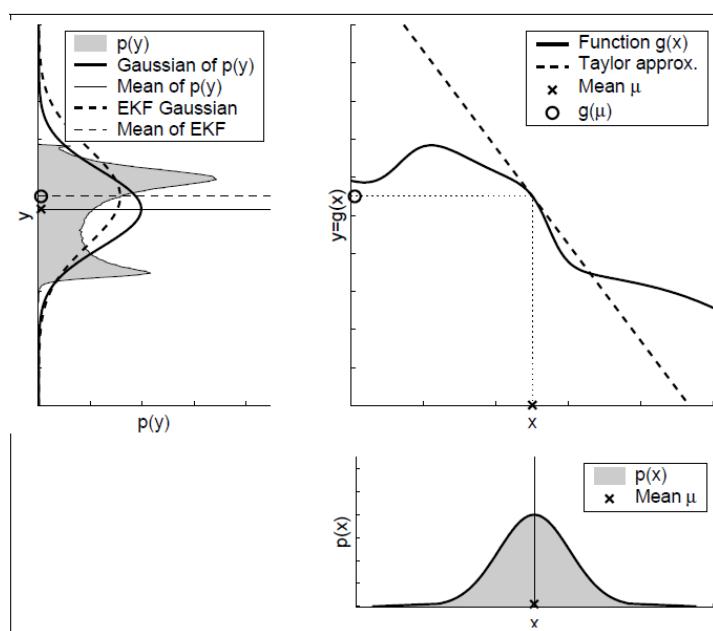
1:   Algorithm Extended Kalman filter( $\mu_{t-1}, \Sigma_{t-1}, u_t, z_t$ ):
2:      $\bar{\mu}_t = g(u_t, \mu_{t-1})$ 
3:      $\bar{\Sigma}_t = G_t \Sigma_{t-1} G_t^T + R_t$ 
4:      $K_t = \bar{\Sigma}_t H_t^T (H_t \bar{\Sigma}_t H_t^T + Q_t)^{-1}$ 
5:      $\mu_t = \bar{\mu}_t + K_t(z_t - h(\bar{\mu}_t))$ 
6:      $\Sigma_t = (I - K_t H_t) \bar{\Sigma}_t$ 
7:     return  $\mu_t, \Sigma_t$ 

```

όπου:

- G_t : Jacobian πίνακας με τις μερικές παραγώγους της g . Αντικαθιστά τους A_t, B_t
- H_t : Jacobian πίνακας για την h . Αντικαθιστά τον C_t

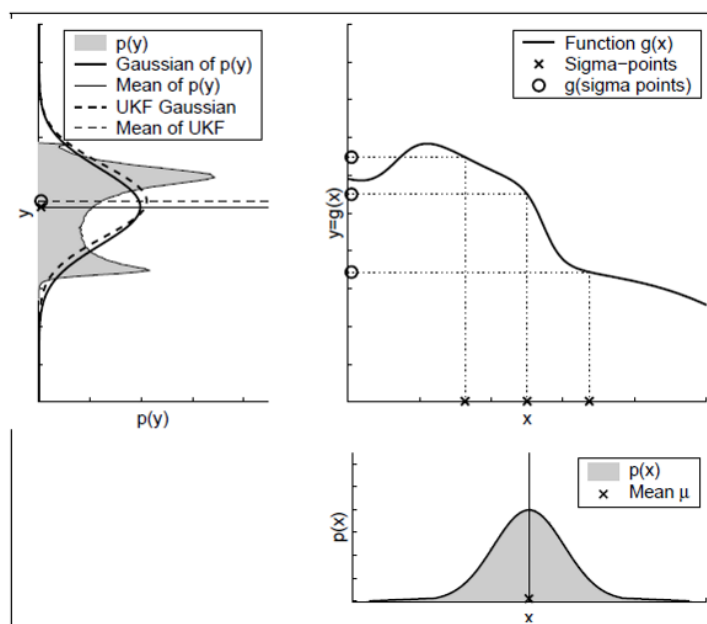
Ένα παραδείγματα της διαδικασίας linearization μέσω του EKF δίνεται στο σχήμα που ακολουθεί. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η Gaussian of $p(y)$ έχει υπολογιστεί μέσω Monte Carlo μεθόδου υψηλής ακρίβειας (και απαιτήσεων σε πόρους).



Σχήμα Παραρτ. Ι. 4 Παράδειγμα της διαδικασίας γραμμικοποίησης στον Extended Kalman Filter

Unscented Kalman Filter

Στον συγκεκριμένο τύπο, ακολουθείται διαφορετική προσέγγιση στην διαδικασία δημιουργίας γραμμικής προσέγγισης των μη γραμμικών συναρτήσεων. Πιο συγκεκριμένα, Εξάγονται $2n + 1$ sigma points το καθένα με κατάλληλο βάρος από την n -διάστατη Gaussian κατανομή. Η ζητούμενη Gaussian κατανομή προκύπτει από τα αποτελέσματα της προβολής των sigma points μέσω της μη γραμμικής συνάρτησης. Ένα παράδειγμα αυτής της διαδικασίας δίνεται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα Παραρτ. Ι. 5 Παράδειγμα της διαδικασίας γραμμικοποίησης στον Unscented Kalman Filter

Έχοντας ορίσει τα παραπάνω, είναι πλέον εφικτή η παρουσίαση του τρόπου εφαρμογής των ΚΕ στην εκτίμηση παραμέτρων Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων. Η παρουσίαση του τρόπου εφαρμογής που ακολουθεί, βασίζεται στην αντίστοιχη που δίνεται στην [60].

Αρχικά, θεωρούμε ότι το Βιολογικό-Βιοχημικό Σύστημα περιγράφεται από το παρακάτω σύστημα εξισώσεων:

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = f(x, u, \theta) \\ \frac{d\theta}{dt} = 0 \\ x(t_0) = x_0 \\ \theta(t_0) = \theta_0 \\ y = h(x) \end{cases}$$

Εξίσωση 6.13

όπου:

- x : Το διάνυσμα καταστάσεων (συγκεντρώσεις/επίπεδα οντοτήτων)
- u : Είσοδος
- y : Το σήμα εξόδου. Αφορά στις ποσότητες που μπορούμε εργαστηριακά να μετρήσουμε.
- h : Η συνάρτηση εξόδου. «Συνδέει» το σήμα εξόδου με τις καταστάσεις και εξαρτάται από τον αρχικό σχεδιασμό του Βιολογικού Πειράματος (π.χ. αν στο αρχικό πείραμα αγνοούνται οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών, αυτή η πληροφορία ενσωματώνεται στο σύστημα μέσω της h .)
- θ : Το διάνυσμα των παραμέτρων (όπως προηγουμένως)

Δεδομένης τώρα της παραδοχής ότι οι παράμετροι είναι σταθερές στο χρόνο, μπορούμε να τις χειριστούμε ως σταθερές συναρτήσεις σε σχέση με αυτόν. Με αυτό τον τρόπο οι καταστάσεις του συστήματος επεκτείνονται ώστε να περιέχουν σταθερές καταστάσεις που αναφέρονται στις παραμέτρους.

Έτσι το πρόβλημα αναμορφώνεται ως εξής:

Αναζητούμε τις αρχικές συνθήκες με τις οποίες όταν αρχικοποιηθεί το παραπάνω σύστημα, λαμβάνουμε την επιθυμητή έξοδο y

Πιο συγκεκριμένα, η f είναι μία ομάδα μη γραμμικών συναρτήσεων που περιγράφει την εξέλιξη του συστήματος ενσωματώνοντας την πληροφορία από τις χημικές αντιδράσεις, τους κινητικούς νόμους τους και τις παραμέτρους αυτών.

Όπως επί παραδείγματι δίνεται στην [67], μπορούμε να έχουμε:

$$\frac{dx}{dt} = SV(x, u)$$

Εξίσωση 6.14

Όπου S ο στοιχειομετρικός πίνακας του συστήματος αντιδράσεων και $V(x, u)$ το διάνυσμα των ρυθμών (rates) των αντιδράσεων ως αποτέλεσμα του κινητικού νόμου για κάθε μία. (επί παραδείγματι $v_1 = k_1 x_1 u$ όπου k_1 η παράμετρος της αντίδρασης, x_1 η συγκέντρωση του πρώτου αντιδρώντος και u η συγκέντρωση του δεύτερου αντιδρώντος που θεωρείται και είσοδος του συστήματος-μέθοδος εξωτερικής παρέμβασης στο σύστημα μέσω αλλαγής των επιπέδων της οντότητας).

Οι παρατηρούμενες μεταβλητές εξόδου του συστήματος ορίζονται βάσει της h και ένα παράδειγμα θα μπορούσε να είναι [67]:

$$y_1 = k_5(x_2 + 2x_3)$$

Εξίσωση 6.15

Όπου x_2, x_3 πραγματικές καταστάσεις του συστήματος. Υπενθυμίζεται ότι η συνάρτηση h ορίζεται βάσει των ιδιαιτεροτήτων του βιολογικού-εργαστηριακού πειράματος μέσω του οποίου λήφθηκαν τα διαθέσιμα δεδομένα και είναι γνωστή από πριν.

Σημαντικό χαρακτηριστικό της χρήσης των Kalman Filter στην εκτίμηση παραμέτρων είναι ο άμεσος τρόπος με τον οποίο μπορούν να ληφθούν υπόψη ο Θόρυβος Συστήματος (εγγενής θόρυβος-intrinsic noise) και ο Θόρυβος Μετρήσεων. Σε όλες τις εργασίες οι οποίες ήταν γνωστές την περίοδο συγγραφής της παρούσας εργασίας, οι δύο μορφές θορύβου λαμβάνονται υπόψη με παρόμοιους τρόπους. Για παράδειγμα στην [67] για την εισαγωγή του εγγενούς θορύβου γίνονται οι ακόλουθες επιλογές:

- Αντί η εξέλιξη των καταστάσεων να περιγράφεται από Συνήθεις Διαφορικές Εξισώσεις (ODEs-όπως στην προηγούμενη διαφάνεια) μπορεί να περιγραφεί από Στοχαστικές Διαφορικές Εξισώσεις (SDEs):

$$dx = SV(x, u)dt + G(t)d\beta(t)$$

Εξίσωση 6.16

όπου $G(t)$ ο πίνακας διασποράς και $\beta(t)$ Brownian κίνηση [126] με πίνακα διάχυσης $Q(t)$.

Όπως αναφέρεται [120] διαισθητικά (intuitively) μπορούμε να πούμε ότι:

$$\frac{dx}{dt} = SV(x, u) + G(t)w(t)$$

Εξίσωση 6.17

Όπου $w(t) = \frac{d\beta}{dt}$ λευκός Gaussian Θόρυβος.

- Διακριτοποίηση των καταστάσεων ώστε να έχουμε συγκεκριμένες μεταβάσεις [120] ως εξής:

$$x_{k+1} = x_k + SV(x_k, u_k) + w_k = f(x_k, u_k, \theta) + w_k$$

Εξίσωση 6.18

Όπου w_k , Ασχυσχέτιστος Gaussian Θόρυβος με μέση τιμή 0 και πίνακα συνδιασποράς Q_k .

Όσον αφορά τον θόρυβο μετρήσεων μπορούμε να ορίσουμε τα εξής [120]:

$$y_k = h(x_k, u_k, \theta) + v_k$$

Εξίσωση 6.19

Όπου και εδώ h είναι ένα διάνυσμα μη γραμμικών συναρτήσεων και v_k είναι Ασχυσχέτιστος Gaussian Θόρυβος με πίνακα συνδιασποράς R_k .

Θα πρέπει, τέλος, να σημειωθεί ότι στην παραπάνω φιλοσοφία οι διαδικασίες w_k και u_k θεωρούνται από κοινού ανεξάρτητες.

Εκτίμηση Παραμέτρων μέσω Bayesian Μεθόδων

Οι μέθοδοι Bayesian Συμπερασμού ή απλώς Bayesian μέθοδοι, καταλαμβάνουν, τα τελευταία χρόνια, όλο και μεγαλύτερο χώρο στις εφαρμογές της μηχανικής μάθησης. Έτσι, και στον χώρο της εκτίμησης παραμέτρων Βιοχημικών Δικτύων οι συγκεκριμένες μέθοδοι έχουν αρχίσει να βρίσκουν εφαρμογή. Αναπόσπαστο κομμάτι της εφαρμογής των μεθόδων αυτών είναι η χρήση Monte Carlo Προσομοιώσεων για την λήψη των αναγκαίων δειγμάτων από τις διάφορες κατανομές πιθανότητας. Έτσι, ακολούθως δίνεται εν συντομία το θεωρητικό υπόβαθρο των Monte Carlo Προσομοιώσεων, σημειώνοντας ότι και ο αλγόριθμος SSA, που παρουσιάστηκε σε προηγούμενη ενότητα, αποτελεί μία Monte Carlo Προσομοίωση. Η ακόλουθη παρουσίαση βασίζεται στην αντίστοιχη που δίνεται στην [127].

Monte Carlo Προσομοίωση

Κεντρική ιδέα της Monte Carlo Προσομοίωσης είναι η λήψη ανεξάρτητων και όμοια κατανεμημένων (independent and identically distributed/i.i.d) δειγμάτων $\{x^{(i)}\}_{i=1}^N$ από μία κατανομή $p(x)$ η οποία συνήθως ορίζεται σε ένα χώρο υψηλών διαστάσεων και δεν είναι εφικτή η απευθείας δειγματοληψία από αυτή. Μέσω αυτών των δειγμάτων μπορούμε να προσεγγίσουμε την κατανομή-στόχο ως εξής:

$$p_N(x) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_{x^{(i)}}(x)$$

Εξίσωση 6.20

Επίσης μέσω των Monte Carlo Προσομοιώσεων, μπορούμε να υπολογίσουμε ολοκληρώματα (ή πολύ μεγάλα αθροίσματα) $I(f)$, μέσω υπολογίσιμων αθροισμάτων $I_N(f)$:

$$I_N(f) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N f(x^{(i)}) \xrightarrow{N \rightarrow \infty} I(f) = \int_{\mathcal{X}} f(x) p(x) dx$$

Εξίσωση 6.21

Η συγκεκριμένη δυνατότητα είναι ιδιαίτερα σημαντική για τον Bayesian Συμπερασμό κατά τον οποίο, χρειάζεται να υπολογίσουμε τον παράγοντα κανονικοποίησης στην θεμελιώδη για τον συμπερασμό εξίσωση

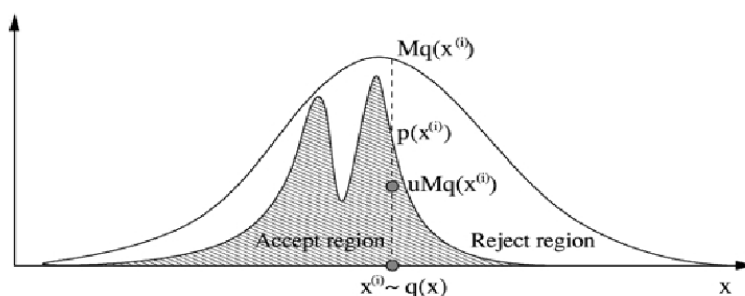
$$p(x|y) = \frac{p(y|x)p(x)}{\int_{\mathcal{X}} p(y|x')p(x')dx'}$$

Εξίσωση 6.22

Η απλούστερη Monte Carlo μέθοδος για την λήψη δειγμάτων είναι η Δειγματοληψία μέσω Απόρριψης (Rejection Sampling):

- Θεωρούμε ότι γνωρίζουμε την $p(x)$ μόνο μέχρι μία σταθερά αναλογίας.
- Τότε μπορούμε να πάρουμε δείγματα από μία προτεινόμενη (proposal) κατανομή $q(x)$ για την οποία ισχύει $p(x) \leq Mq(x), M < \infty$ και να τα δεχτούμε ως δείγματα της $p(x)$ ως εξής:
 - Θέσε $i = 1$
 - Επανάλαβε μέχρι $i = N$
 1. Λήψη δείγματος $x^{(i)} \sim q(x)$ και $u \sim U_{(0,1)}$
 2. Αν $u < \frac{p(x^{(i)})}{Mq(x^{(i)})}$ τότε αποδοχή του $x^{(i)}$ και αύξηση του i κατά 1. Αλλιώς απόρριψη του δείγματος.

Ακολούθως δίνεται ένα παράδειγμα αυτής της διαδικασίας δίνεται στο ακόλουθο σχήμα:



Σχήμα Παραρτ. Ι. 6 Παράδειγμα εκτέλεσης της μεθόδου Rejection Sampling

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το ότι δεν μπορούμε να φράξουμε πάντα το $p(x)/q(x)$ με μία σταθερά M σε ολόκληρο το χώρο καταστάσεων, ενώ αν αυξηθεί αρκετά το M , τότε η πιθανότητα αποδοχής θα μικρύνει πάρα πολύ.

Επειδή τώρα στην γενική περίπτωση είναι αρκετά δύσκολο να βρεθεί η προτεινόμενη κατανομή $q(x)$ τέτοια ώστε να είναι καλή προσέγγιση και εύκολη στην δειγματοληψία ώστε να χρησιμοποιηθούν οι προηγούμενες μέθοδοι, προτείνονται οι Markov Chain Monte Carlo Μέθοδοι μέσω των οποίων:

- Δημιουργούνται δείγματα $x^{(i)}$ μέσω μίας Markov Chain που κινείται στον χώρο καταστάσεων X .
- Η Markov Chain είναι έτσι ορισμένη ώστε να κινείται κυρίως σε περιοχές υψηλής σημασίας (ανάλογα με την περιοχή της $p(x)$ που μας ενδιαφέρει).
- Μέσω της Markov Chain μπορούμε να λαμβάνουμε δείγματα τα οποία ομοιάζουν με δείγματα της $p(x)$.
- Η στοχαστική διαδικασία είναι μία Markov αλυσίδα αν ισχύει $p(x^{(i)} | x^{(i-1)}, \dots, x^{(1)}) = T(x^{(i)} | x^{(i-1)})$ όπου T ο πίνακας των μεταβάσεων που περιέχει τις πιθανότητες μετάβασης από μία κατάσταση σε μία άλλη.
- Ασχέτως της αρχικής κατάστασης που θα ξεκινήσει η προσομοίωση, η Markov Chain θα συγκλίνει στην κατανομή στόχο $p(x)$ αν ισχύουν τα παρακάτω:
 - **Irreducibility:** Από κάθε κατάσταση της Markov αλυσίδας να υπάρχει πάντα πιθανότητα να μεταβούμε σε οποιαδήποτε άλλη κατάσταση
 - **Aperiodicity:** Η αλυσίδα δεν θα πρέπει να παγιδεύεται σε κύκλους
- Επίσης, αν και όχι αναγκαία, μία συνθήκη διασφάλισης της σύγκλισης είναι η detailed balance condition (αντιστρεψιμότητα)

$$p(x^{(i)})T(x^{(i-1)} | x^{(i)}) = p(x^{(i-1)})T(x^{(i)} | x^{(i-1)})$$

Εξίσωση 6.23

Ο πλέον διαδεδομένος MCMC είναι ο αλγόριθμος Metropolis-Hastings (MH). Μάλιστα, οι περισσότεροι MCMC αλγόριθμοι που χρησιμοποιούνται στην πράξη, μπορούν να οριστούν ως ειδικές περιπτώσεις οι επεκτάσεις του. Τα βήματα του αλγορίθμου έχουν ως εξής:

1. Αρχικοποίηση της $x^{(0)}$
2. Για $i = 0$ μέχρι $N - 1$
 - a. Λήψη δείγματος $u \sim U_{(0,1)}$
 - b. Λήψη δείγματος $x^* \sim q(x^* | x^{(i)})$
 - c. Αν $u < A(x^{(i)}, x^*) = \min\{1, \frac{p(x^*)q(x^{(i)} | x^*)}{p(x^{(i)})q(x^* | x^{(i)})}\}$

$$x^{(i+1)} = x^*$$

αλλιώς

$$x^{(i+1)} = x^{(i)}$$

Αν και ο ΜΗ μπορεί να θεωρηθεί απλή μέθοδος, απαιτεί προσεκτική επιλογή της προτεινόμενης κατανομής $q(x^*|x)$.

Ο πυρήνας μετάβασης (transition kernel) του ΜΗ αλγορίθμου είναι:

$$K_{\text{MH}}(x^{(i+1)} | x^{(i)}) = q(x^{(i+1)} | x^{(i)}) A(x^{(i)}, x^{(i+1)}) + \delta_{x^{(i)}}(x^{(i+1)}) r(x^{(i)}),$$

Εξίσωση 6.24

και αποδεικνύεται ότι ο παραπάνω πυρήνας καλύπτει την detailed balance condition και έτσι έχει ως invariant κατανομή την $p(x)$. Επίσης αποδεικνύεται η σύγκλιση του ΜΗ, καλύπτοντας τα κριτήρια της μη περιοδικότητας και της πιθανότητας όλες οι καταστάσεις να είναι επισκέψιμες.

Δύο απλές μορφές του ΜΗ αλγορίθμου είναι:

- Independent sampler όπου $q(x^*|x^{(i)}) = q(x^*)$ και έτσι $A(x^{(i)}, x^*) = \min\{1, \frac{p(x^*)q(x^{(i)})}{p(x^{(i)})q(x^*)}\}$
- Metropolis Algorithm όπου $q(x^*|x^{(i)}) = q(x^{(i)}|x^*)$ (τυχαίος συμμετρικός περίπατος) και έτσι $A(x^{(i)}, x^*) = \min\{1, \frac{p(x^*)}{p(x^{(i)})}\}$

Για τον ΜΗ θα πρέπει να σημειωθούν τα εξής:

- Δεν απαιτείται η γνώση της σταθεράς κανονικοποίησης της κατανομής στόχου.
- Αρκεί μόνο η γνώση της κατανομής στόχου μέχρι μία σταθερά αναλογίας.
- Μπορούν, εύκολα, να προσομοιωθούν πολλές αλυσίδες παράλληλα.

Στην ακόλουθη ενότητα δίνονται αντιπροσωπευτικά παραδείγματα εφαρμογής των Bayesian μεθόδων στην εκτίμηση παραμέτρων Δικτύων Βιοχημικών Αντιδράσεων.

Εφαρμογές Bayesian μεθόδων στην Εκτίμηση Παραμέτρων

Στην παρούσα ενότητα επιλέχθηκε να παρουσιαστούν δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα εφαρμογής των Bayesian μεθόδων. Η βασική διαφορά στις συγκεκριμένες εργασίες έγκειται στην επιλογή του τρόπου μοντελοποίησης του συστήματος.

Στην εργασία «*Bayesian inference for nonlinear multivariate diffusion models observed with error*» [128] χρησιμοποιούνται για την μοντελοποίηση των καταστάσεων του συστήματος, στοχαστικές διαφορικές εξισώσεις υλοποιώντας την diffusion approximation. Έτσι η διαδικασία μοντελοποιείται ως εξής:

$$dY(t) = \mu(Y(t), \theta)dt + \beta^{\frac{1}{2}}(Y(t), \theta) dW(t)$$

Εξίσωση 6.25

η οποία σε διακριτοποιημένη μορφή δίνεται ως εξής:

$$\Delta Y(t) = \mu(Y(t), \theta) \Delta t + \beta^{\frac{1}{2}}(Y(t), \theta) \Delta W(t)$$

Εξίσωση 6.26

Επίσης θεωρείται ότι διαθέτουμε μόνο μερικά δεδομένα, δηλαδή για κάποιες οντότητες του συστήματος δεν μπορούμε να έχουμε μετρήσεις, έτσι $Y(t) = (X(t), Z(t))$ (παρατηρήσιμο, μη παρατηρήσιμο).

Ακόμα, θεωρείται ότι υπάρχει θόρυβος παρατήρησης $\varepsilon(t) \sim N(0, \Sigma)$, $\Sigma = \text{diag}\{\sigma_i^2\}$ (έτσι για άγνωστο Σ έχουμε $\theta = (\theta_1, \dots, \theta_p, \sigma_1, \dots, \sigma_{d_1})$ όπου d_1 το μέγεθος του παρατηρήσιμου μέρους.

Αν, τώρα, διαθέτουμε $u(\tau_i)$ με διαστήματα μήκους $\Delta^* = \tau_{i+1} - \tau_i$, επειδή συνήθως το Δ^* είναι πολύ μεγάλο θέτουμε $\Delta t = \frac{\Delta^*}{m}$ αλλά τότε απουσιάζουν $m - 1$ τιμές μεταξύ των παρατηρήσεων. Συνολικά για όλη την διαδικασία απουσιάζουν $d(Tm + 1)$ τιμές τις οποίες τις αντικαθιστούμε με προσομοιώσεις $Y(t_i)$ (τα δεδομένα από προσομοιώσεις χαρακτηρίζονται ως επανυξημένα δεδομένα-augmented data) και έτσι ορίζεται ο πίνακας

$$\hat{Y} = \begin{pmatrix} X_1(t_0) & X_1(t_1) & \cdots & X_1(t_m) & X_1(t_{m+1}) & \cdots & X_1(t_n) \\ X_2(t_0) & X_2(t_1) & \cdots & X_2(t_m) & X_2(t_{m+1}) & \cdots & X_2(t_n) \\ \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots & & \vdots \\ X_{d_1}(t_0) & X_{d_1}(t_1) & \cdots & X_{d_1}(t_m) & X_{d_1}(t_{m+1}) & \cdots & X_{d_1}(t_n) \\ Z_1(t_0) & Z_1(t_1) & \cdots & Z_1(t_m) & Z_1(t_{m+1}) & \cdots & Z_1(t_n) \\ \vdots & \vdots & & \vdots & \vdots & & \vdots \\ Z_{d_2}(t_0) & Z_{d_2}(t_1) & \cdots & Z_{d_2}(t_m) & Z_{d_2}(t_{m+1}) & \cdots & Z_{d_2}(t_n) \end{pmatrix}.$$

Αν $Y^i = (X^i, Z^i)$ στην Bayesian προσέγγιση δίνουμε την πρότερη γνώση μας για τις παραμέτρους θ και την αρχική κατάσταση Y^0 μέσω των prior κατανομών $\pi(\theta)$ και $\pi(Y^0)$. Έτσι η από κοινού posterior κατανομή (JPD) για τις παραμέτρους και για τα augmented data είναι:

$$\pi(\tilde{Y}, \theta | D_n) \propto \pi(\theta) \pi(Y^0) \left[\prod_{i=0}^{n-1} \pi(Y^{i+1} | Y^i, \theta) \right] \left[\prod_{i \in \{0, m, \dots, n\}} \pi(u^i | X^i, \theta) \right]$$

Εξίσωση 6.27

Όπου u^i τα δεδομένα $u(t_i)$ ($D_n = (u^0, u^1, \dots, u^n)$)

$$\pi(Y^{i+1} | Y^i, \theta) = N(Y^{i+1}; Y^i + \mu_i \Delta t, \beta_i \Delta t)$$

Και $\pi(u^i | X^i, \theta) = N(u^i; X^i, \Sigma)$

Ο απαιτούμενος συμπερασμός για την JPD μπορεί να γίνει εναλλάσσοντας:

- Προσομοίωση των παραμέτρων δεδομένων των augmented data

- Προσομοίωση των απόντων δεδομένων των παρατηρήσιμων δεδομένων και τις τρέχουσες τιμές των παραμέτρων

Λόγω των υψηλών διαστάσεων της JPD η κατάλληλη μέθοδος για την δειγματοληψία από αυτή είναι ο Gibbs Sampler [129] (μία ειδική περίπτωση του αλγορίθμου MH). Ωστόσο πολλές σχετικές προτεινόμενες μέθοδοι αντιμετωπίζουν κάποια από τα παρακάτω προβλήματα:

- Όσο αυξάνεται ο αριθμός m των augmented data τόσο καθυστερεί η σύγκλιση
- Υπάρχει σημαντική εξάρτηση μεταξύ των παραμέτρων και της διαδικασίας Y κάτι που οδηγεί σε καθυστέρηση της σύγκλισης όταν αυξάνεται ο αριθμός m ή τα διαθέσιμα δεδομένα.

Για την αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών προτείνεται η μέθοδος Innovation Scheme, η οποία δεν αντιμετωπίζει τα παραπάνω προβλήματα σύγκλισης. Αυτό επιτυγχάνεται δειγματοληπτώντας από την posterior των παραμέτρων θ και την διαδικασία $W(t)$ και όχι την διαδικασία $Y(t)$ κάτι που απαλλάσσει την μέθοδο από της εξαρτήσεις μεταξύ θ και Y .

Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε diffusion διαδικασία (που μπορεί να υπόκειται σε λάθος μετρήσεων) χωρίς να υπάρχει ανάγκη για:

- Μετατροπή diffusion συνιστώσας ώστε να είναι ανεξάρτητη από τις παραμέτρους θ
- Γνώση της πυκνότητας πιθανότητας της παρατηρήσιμης διαδικασίας δεδομένης της μη παρατηρήσιμης

ενώ ταυτόχρονα η μη παρατηρήσιμη διαδικασία μπορεί να εξαρτάται και μη-γραμμικά από την παρατηρήσιμη.

Η μέθοδος innovation scheme βασίζεται στην εξής αρχή:

Μεταξύ των δειγμάτων της $W(t)$ διαδικασίας $\tilde{W}$ και των δειγμάτων της $Y(t)$ διαδικασίας $\tilde{Y}$ υπάρχει μία 1-1 σχέση δεδομένων των παραμέτρων θ .

Έτσι η μέθοδος έχει ως εξής:

1. Αρχικοποίηση των αγνώστων μεγεθών.
2. Δειγματοληψία του $\tilde{W}$ δεδομένων των παραμέτρων θ και των δεδομένων, ενημερώνοντας τα augmented δεδομένα $\tilde{Y}$ μέσω της $(\tilde{Y}|\theta, D_n)$
3. Ενημέρωση των παραμέτρων μέσω της $(\theta|\tilde{W}, D_n)$
4. Επιστροφή στο Βήμα 2

Τα βήματα 2 και 3 πραγματοποιούνται μέσω του αλγορίθμου Metropolis-Hastings και λεπτομέρειες για τις επιλογές εντός αυτών δίνονται στην εργασία.

Σε αντίθεση, τώρα, με την προηγούμενη εργασία, στην «Bayesian inference for a discretely observed stochastic kinetic model» [130] δεν υιοθετείται κάποια προσεγγιστική μέθοδος στην μοντελοποίηση του συστήματος. Παρά την καλή απόδοση των μεθόδων που βασίζονται στην diffusion approximation, δεν παύουν να απορρίπτουν την διακριτή φύση των διαδικασιών που περιγράφουν τα συστήματα. Επίσης, εργασίες όπως η [66], έχουν δείξει ότι η υιοθέτηση μοντελοποιήσεων ακριβείας (exact) στην εκτίμηση παραμέτρων, μπορεί να δώσει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με τις προσεγγιστικές. Η συγκεκριμένη εργασία αποτελεί από τις πρώτες προσπάθειες χρήσης του exact μοντέλου στην εκτίμηση παραμέτρων μέσω Bayesian Συμπερασμού και όπως αναφέρεται, σίγουρα μπορούν να υπάρξουν περαιτέρω βελτιώσεις στην απόδοσή του και έτσι, ακόμα, έχει κυρίως θεωρητική αξία. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η συγκεκριμένη προσέγγιση θεωρείται ιδιαίτερα απαιτητική σε πόρους για προβλήματα ρεαλιστικού μεγέθους [37] σε αντίθεση με τις προσεγγιστικές μεθόδους.

Όπως και στην προηγούμενη εργασία η μέθοδος καλύπτει και την περίπτωση όπου κάποιες από τις οντότητες του συστήματος δεν είναι παρατηρήσιμες. Η μέθοδος που ακολουθείται στην εργασία έχει ως εξής:

Περίπτωση με Πλήρη Δεδομένα:

- Η likelihood των παραμέτρων είναι:

$$\pi(y|\theta) = \{\prod_{i=0}^{T-1} \prod_{j=1}^{n_i} h_{k_{ij}}\{y(t_{i,j-1}), \theta_{k_{ij}}\}\} \times \exp\left\{-\int_0^T h_0\{y(t), \theta\} dt\right\}$$

όπου;

- ο $n_i = \sum_{k=1}^u r_{ki}$ ο αριθμός των αντιδράσεων στο χρονικό διάστημα $(i, i + 1]$ με τύπους και χρονικές στιγμές (t_{ij}, k_{ij})
- και $h_k(Y, \theta_k) = \theta_k g_k(Y)$ η propensity(hazard) function των αντιδράσεων, όπου g_k ορίζεται από τον κινητικό νόμο που υιοθετείται (εδώ mass action)
- Ορίζεται prior κατανομή για τις παραμέτρους $\theta_k \sim \Gamma(a_k, b_k)$
- Εφαρμόζοντας τον κανόνα του Bayes η posterior (θεωρώντας ανεξάρτητες παραμέτρους) είναι: $\theta_k | y \sim \Gamma(a_k + r_k, b_k + \int_0^T g_k\{y(t)\} dt)$ με r_k τον αριθμό των αντιδράσεων είδους k που πραγματοποιήθηκαν στο χρονικό διάστημα $(0, T]$.

Επειδή, τώρα, οι διαθέσιμες μετρήσεις είναι διακριτές, θεωρούμε δεδομένα $y = \{y(t) = (y_1(t), y_2(t), \dots, y_u(t)) \text{ με } t = 0, 1, 2, \dots, T$

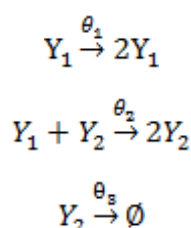
Έχοντας ορίσει την prior κατανομή για τις παραμέτρους η posterior για αυτές δοσμένων των δεδομένων y μπορεί να υπολογιστεί μέσω μίας MCMC διαδικασίας δύο σταδίων:

- Μία προσομοίωση της διαδικασίας y δεδομένων των παραμέτρων θ και των δεδομένων y μέσω της $\pi(y|y, \theta) = \prod_{i=0}^{T-1} \frac{\pi\{y(i+1)|y(i), \theta\}}{\pi\{y(i+1)|y(i), \theta\}}$ όπου $y(i, i+1] = \{y(t); t \in (i, i+1]\}$

Όπως παρατηρούμε η προσομοίωση μπορεί να γίνει τμηματικά για κάθε χρονικό διάστημα $(i, i+1]$ δεδομένων $y(i, i+1), y(i), y(i+1)$.

- Μία προσομοίωση των παραμέτρων δεδομένης της διαδικασίας y μέσω της $\theta_k|y$

Οι μέθοδοι που ακολουθούνται για την ανωτέρω προσομοίωση περιγράφονται στην σχετική εργασία μέσω παραδείγματος. Χρησιμοποιείται το μοντέλο Lotka-Volterra το οποίο ορίζεται ως ακολούθως:



Για το συγκεκριμένο μοντέλο χρησιμοποιούνται mass action κινητικοί νόμοι.

Θέτοντας, τώρα, τις prior ως Γ κατανομές με ανεξάρτητες παραμέτρους, οι posterior είναι:

ως Γ κατανομές με ανεξάρτητες παραμέτρους, posterior είναι:

$$\theta_1|y \sim \Gamma(\alpha_1 + r_1, b_1 + \int_0^T y_1(t) dt)$$

Εξίσωση 6.28

$$\theta_2|y \sim \Gamma(\alpha_2 + r_2, b_2 + \int_0^T y_1(t)y_2(t) dt)$$

Εξίσωση 6.29

$$\theta_3|y \sim \Gamma(\alpha_3 + r_3, b_3 + \int_0^T y_2(t) dt)$$

Εξίσωση 6.30

Έτσι, το πρόβλημα της εκτίμησης παραμέτρων αποτελεί η εκτίμηση των posterior κατανομών, διαθέτοντας δεδομένα για τις $y_1(t)$, $y_2(t)$, μέσω προσομοιώσεων για κάθε χρονικό διάστημα $(i, i+1]$.

Για την πραγματοποίηση της προσομοίωσης προτείνονται οι εξής δύο μέθοδοι:

- **Reversible Jump:** Επειδή ούτε ο χρόνος και το είδος συγκεκριμένων αντιδράσεων αλλά ούτε και ο αριθμός το συνόλου των αντιδράσεων είναι γνωστών για κάθε διάστημα, η μέθοδος (αποτελεί γενικότερη MCMC μέθοδο)
 - ο μέσω γραμμικού προγραμματισμού υπολογίζει τον ελάχιστο αριθμό πραγματοποιήσεως κάθε αντίδρασης
 - ο εκμεταλλεύεται τη φύση του συστήματος (όπου κάθε τριπλέτα αντιδράσεων δεν προκαλεί αλλαγή στα επίπεδα των αντιδράσεων),
 - ο Εισάγει, διαγράφει ή μεταθέτει τριπλέτες αντιδράσεων εντός κάθε διαστήματος με συγκεκριμένες πιθανότητες
 - ο Διαμορφώνει μία MH acceptance probability που βασίζεται στον αριθμό αντιδράσεων από κάθε είδος.
- **Block updating**
 - ο Μέθοδος μέσω της οποίας προτείνεται η αντικατάσταση του χρονικού διαστήματος από αυτό μίας παρόμοιας διαδικασίας.
 - ο Εδώ χρησιμοποιείται μία block updating στρατηγική,.Μία προτεινόμενη τιμή για τον αριθμό των αντιδράσεων τύπου $1(\tilde{r}_{1i})$, λαμβάνεται από μία συνάρτηση $f(\tilde{r}_{1i}|r_{1i})$ και μέσω αυτής και των επιπέδων των οντοτήτων στο τέλος του διαστήματος συμπεραίνονται οι $\tilde{r}_{2i}$ και $\tilde{r}_{3i}$.
 - ο Δημιουργούνται προτάσεις για τις χρονικές στιγμές των αντιδράσεων, προσεγγίζοντας την κάθε διαδικασία αντίδρασης μέσω ανεξάρτητων Poisson διαδικασιών με ρυθμούς που κυμαίνονται μεταξύ της propensity στην αρχή και στο τέλος του διαστήματος:

$$\lambda_{ki}(t) = (i + 1 - t)h_k\{y(i), \theta_k\} + (t - i)h_k\{y(i + 1), \theta_k\}, t \in [i, i + 1]$$

Εξίσωση 6.31

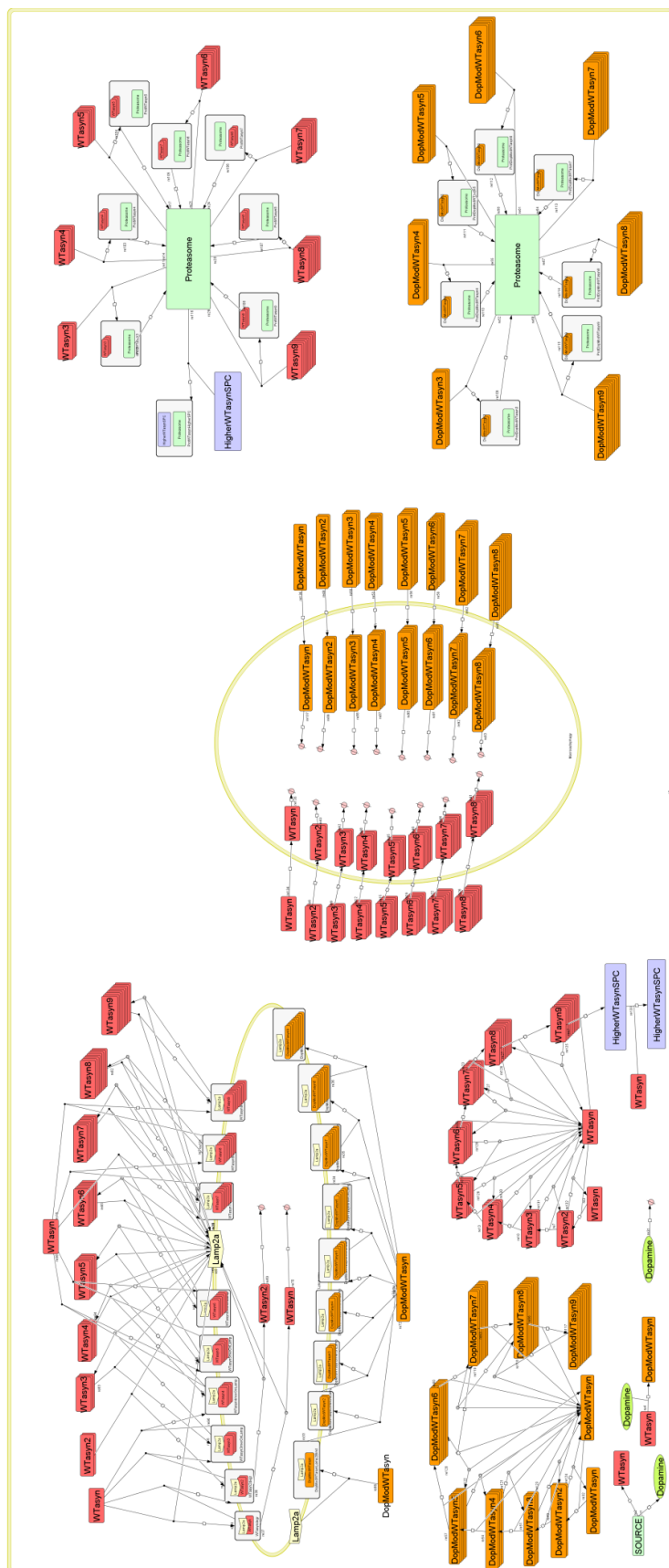
Περίπτωση με Πλήρη Δεδομένα:

Η συγκεκριμένη περίπτωση περιγράφεται και αυτή μέσω του ίδιου, με προηγουμένως, παραδείγματος. Ειδικότερα, αν διαθέτουμε δεδομένα μόνο για μία από τις δύο οντότητες, έστω για την y_1 , τότε θα πρέπει να γίνουν τροποποιήσεις στην διαδικασία οι οποίες είναι:

- Πρέπει να οριστεί prior κατανομή για τα επίπεδα της y_2 , $\pi\{y_2(0)\}$
- Η προσομοίωση της posterior $\pi(y[0,T], \theta|y_1)$ μέσω MCMC γίνεται με παρόμοιο τρόπο με πριν, ωστόσο, σε αυτή την περίπτωση αντί να ενημερώνεται ένα χρονικό διάστημα κάθε φορά ενημερώνονται δύο σε ζευγάρια προσομοιώνοντας από την $y(i, i + 2)|\theta, y(i), y_1(i + 1), y(i + 2)$ ως εξής:
- Σε κάθε ενημέρωση ζευγαριού τα επίπεδα των δύο οντοτήτων παραμένουν σταθερά στα δύο άκρα
- Ενδιάμεσα τα επίπεδα της y_1 παραμένουν σταθερά και τα επίπεδα της y_2 κυμαίνονται.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Η συνολική δομή του προτεινόμενου Μοντέλου σε SBGN



ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/History_of_biology.
- [2] National Human Genome Research Institute, May 2010. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.genome.gov/25019887>.
- [3] Βικιπαίδεια ελεύθερη εγκυκλοπαίδεια, Οκτώβριος 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%97_%CE%BA%CE%B1%CF%84%CE%B1%CE%B3%CF%89%CE%B3%CE%AE_%CF%84%CF%89%CE%BD_%CE%B5%CE%B9%CE%B4%CF%8E%CE%BD.
- [4] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Genetics>.
- [5] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Mendelian_inheritance.
- [6] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction.
- [7] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Genetic_screen.
- [8] Wikipedia, the free encyclopedia, September 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Genetic_linkage.
- [9] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Bioinformatics>.
- [10] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_sequencing.
- [11] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Pattern_recognition.

- [12] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011 . [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Data_mining.
- [13] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011 . [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Machine_learning.
- [14] Wikipedia, the free encyclopedia, February 2011 . [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Biological_Data_Visualization.
- [15] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011 . [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Genome_assembly#Genome_assembly.
- [16] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011 . [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Sequence_alignment.
- [17] Wikipedia, the free encyclopedia, 2011 October . [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Bioinformatics#Genome_annotation.
- [18] Wikipedia, the free encyclopedia, 2011 July. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_structural_alignment.
- [19] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011 . [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Protein_structure_prediction.
- [20] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Bioinformatics#Analysis_of_regulation.
- [21] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011 . [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Protein%E2%80%93protein_interactions.
- [22] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011 . [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Genome-wide_association_studies.
- [23] H. Kitano, «Systems biology: a brief overview.,» *Science*, τόμ. 295, αρ. 5560, pp. 1662-4, March 2002.
- [24] U. Mukhtar και W. Olaf, «Stochastic approaches in systems biology,» *WIREs Syst Biol*

- Med*, τόμ. 2, pp. 385-397, 2010.
- [25] Wikipedia, the free encyclopedia, «Avogadro constant,» October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Avogadro_constant.
- [26] F. Schlögl, «Chemical reaction models for non-equilibrium phase transitions,» *Z Physik A Hadrons d Nucl*, αρ. 253, pp. 147-161, 1972.
- [27] Hucka M. et al., «The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models.,» *Bioinformatics*, τόμ. 19, αρ. 4, pp. 524-31, 2003.
- [28] Wikipedia, the free encyclopedia, August 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/SBML>.
- [29] [Ηλεκτρονικό]. Available: sbml.org/.
- [30] [Ηλεκτρονικό]. Available: http://www.sbgn.org/Main_Page.
- [31] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/XML>.
- [32] Wikipedia, the free encyclopedia, September 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Systems_Biology_Graphical_Notation.
- [33] Moodie SL. et al., «Systems Biology Graphical Notation: Process Description language Level 1,» *Nature Precedings*, 2011.
- [34] Le Novère N. et al., «Systems Biology Graphical Notation: Entity Relationship language Level 1,» *Nature Precedings* (2010).
- [35] Mi H. et al., «Systems Biology Graphical Notation: Activity Flow language Level 1,» *Nature Precedings* (2009).
- [36] D. T. Gillespie, «Stochastic Simulation of Chemical Kinetics,» *Annu. Rev. Phys. Chem.*, αρ. 58, pp. 35-55, October 2007.
- [37] D. J. Wilkinson, «Stochastic modelling for quantitative description of heterogeneous

- biological systems,» *Nature Reviews Genetics*, αρ. 10, pp. 122-133, February 2009.
- [38] Wikipedia, the free encyclopedia, «Monte Carlo method,» Οκτώβριος 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Monte_Carlo_method.
- [39] D. T. Gillespie, «A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions,» *J. Comput. Phys.*, αρ. 22, pp. 403-34, 1976.
- [40] D. T. Gillespie, «Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions.,» *J. Phys. Chem*, αρ. 81, p. 2340–61, 1977.
- [41] M. Gibson και J. Bruck, «Efficient exact stochastic simulation of chemical systems with many species and many channels.,» *J Phys ChemA*, τόμ. 104, αρ. 9, pp. 1876-89, 2000.
- [42] J. Pahle, «Biochemical simulations: stochastic, approximate stochastic and hybrid approaches,» *Brief Bioinform*, τόμ. 10, αρ. 1, pp. 53-64, January 2009.
- [43] D. T. Gillespie, «Approximate accelerated stochastic simulation,» *J Chem Phys*, τόμ. 115, αρ. 4, pp. 1716-33, 2001.
- [44] D. T. Gillespie, «The chemical Langevin equation.,» *JChemPhys*, τόμ. 113, αρ. 1, pp. 297-306, 2000.
- [45] Wikipedia, the free encyclopedia, August 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Stochastic_differential_equation.
- [46] Sven Sahle et al., «A new strategy for assessing sensitivities in biochemical models,» *Phil. Trans. R. Soc.*, αρ. 366, pp. 3619-3631, 2008.
- [47] B. Ingalls, «Sensitivity analysis: from model parameters to system behaviour.,» *Essays Biochem*, αρ. 4, pp. 177-93, 2008.
- [48] Alberto de la Fuente et al., «Metabolic control in integrated biochemical systems,» *Eur. J. Biochem.*, αρ. 269, p. 4399–4408, 2002.
- [49] Wikipedia, the free encyclopedia, «Effector (biology),» August 2011. [Ηλεκτρονικό].

- Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Effector_%28biology%29.
- [50] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Lyapunov_exponent.
- [51] COPASI, March 2009. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://copasi.org/tiki-index.php?page=OD.Lyapunov.Exponents.Calculation>.
- [52] Irina Surovtsova et al., «Accessible methods for the dynamic time-scale decomposition of biochemical systems,» *Bioinformatics*, τόμ. 25, αρ. 21, pp. 2816-2823, 2009.
- [53] COPASI, March 2009. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://copasi.org/tiki-index.php?page=OD.Time.Scale.Separation.Analysis&structure=OD>.
- [54] COPASI, February 2009. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://copasi.org/tiki-index.php?page=OD.Steady.State.Calculation&structure=OD>.
- [55] M. Quach, N. Brunel και F. d'Alche-Buc, «Estimating parameters and hidden variables in non-linear state-space models based on ODEs for biological networks inference,» *Bioinformatics*, τόμ. 23, αρ. 23, pp. 3209-3216, Οκτώβριος 2007.
- [56] Wikipedia, the free encyclopedia, Οκτώβριος 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Global_optimization.
- [57] S. Baker, K. Schallau και B. Junker, «Comparison of different algorithms for simultaneous estimation of multiple parameters in kinetic metabolic models,» *Journal of Integrative Bioinformatics*, τόμ. 7, αρ. 3, Μάρτιος 2010.
- [58] G. G. Moles, P. Mendes και J. R. Bang, «Parameter Estimation in Biochemical Pathways: A Comparison of Global Optimization Methods,» *Genome Res.*, τόμ. 13, αρ. 11, p. 2467–2474, Νοέμβριος 2003.
- [59] COPASI, March 2009. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://copasi.org/tiki-index.php?page=OD.Optimization.Methods&structure=OD>.
- [60] G. Lillacci και M. Khammash, «Parameter Estimation and Model Selection in Computational Biology,» *PLoS Comput Biol*, τόμ. 6, αρ. 3, p. e1000696, 2010.

- [61] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Likelihood_function.
- [62] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Bayesian_statistics.
- [63] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Bayesian_inference.
- [64] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Kalman_filter.
- [65] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Particle_filter.
- [66] Tianhai Tian et al., «Simulated maximum likelihood method for estimating kinetic rates in gene expression,» *Bioinformatics*, τόμ. 23, αρ. 1, pp. 84-91, 2007.
- [67] Sun X. et al., «Extended Kalman Filter for Estimation of Parameters in Nonlinear State-Space Models of Biochemical Networks,» *PLoS ONE*, τόμ. 3, αρ. 11, p. e3758, 2008.
- [68] Ελληνική εταιρεία εθελοντών και ασθενών για την ν.Πάρκινσον, Οκτώβριος 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.parkinsonportal.gr/parkinson.php?s=JSJ4hQ-6nyH-B40>.
- [69] Λ. Στεφανής, «Η νόσος Πάρκινσον (Parkinson Disease),» [Ηλεκτρονικό]. Available: http://www.hsfh.gr/hsfn/index.php?option=com_content&task=view&id=177&Itemid=182.
- [70] Pakkenberg B. et al., «The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method.,» *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, τόμ. 54, αρ. 1, pp. 30-33, Ιανουάριος 1991.
- [71] Wikipedia, the free encyclopedia, Οκτώβριος 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Dopamine>.

- [72] National Parkinson Foundation, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://www.parkinson.org/Parkinson-s-Disease/PD-101/What-is-Parkinson-s-disease>.
- [73] Leong SL. et al., «Modulation of α -Synuclein Aggregation by Dopamine: A Review,» *Neurochemical Research*, τόμ. 43, αρ. 10, pp. 1838-46, Οκτώβριος 2009.
- [74] Polymeropoulos M.H. et al., «Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease.,» *Science*, τόμ. 276, αρ. 5321, pp. 2045-7, Jun 1997.
- [75] B. Thomas και M. F. Beal, «Parkinson's disease,» *Human Molecular Genetics*, τόμ. 16, αρ. 2, pp. R183-R194, 2007.
- [76] Βικιπαίδεια ελεύθερη εγκυκλοπαίδεια, Αύγουστος 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%92%CE%B1%CF%83%CE%B9%CE%BA%CE%AC_%CE%93%CE%AC%CE%B3%CE%B3%CE%BB%CE%B9%CE%B1AC%CE%B3%CE%B3%CE%BB%CE%B9%CE%B1.
- [77] C. Kim και S. Lee, «Controlling the mass action of alpha-synuclein in Parkinson's disease.,» *J Neurochem*, τόμ. 107, αρ. 2, pp. 303-16, October 2008.
- [78] Vekrellis K. et al., «Neurobiology of alpha-synuclein,» *Mol Neurobiol*, τόμ. 30, αρ. 1, pp. 1-21, August 2004.
- [79] Wikipedia, the free encyclopedia, September 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Chaperone_%28protein%29.
- [80] Zarranz J.J. et al., «The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia.,» *Annals of neurology*, τόμ. 2, αρ. 55, pp. 164-73, Feb 2004.
- [81] Krüger R. et al., «Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease.,» *Nature Genetics*, τόμ. 2, αρ. 18, pp. 106-8, Feb 1998.
- [82] Singleton A.B. et al., «alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease.,» *Science*, τόμ. 302, αρ. 5646, p. 841, Oct 2003.
- [83] M. C. Chartier-Harlin et al., «Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease.,» *Lancet*, τόμ. 364, αρ. 9440, pp. 1167-9, Sep 2004.

- [84] Ibáñez P. et al., «Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease.,» *Lancet*, τόμ. 364, αρ. 9440, pp. 1169-71, Sep 2004.
- [85] M. D. Maraganore et al., «Collaborative analysis of alpha-synuclein gene promoter variability and Parkinson disease.,» *JAMA*, τόμ. 296, αρ. 6, pp. 661-70, Aug 2006.
- [86] Vogiatzi T. et al., «Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy and macroautophagy in neuronal cells.,» *The journal of biological chemistry*, τόμ. 35, αρ. 283, pp. 23542-56, Aug 2008.
- [87] Vekrellis K. et al., «Inducible over-expression of wild type alpha-synuclein in human neuronal cells leads to caspase-dependent non-apoptotic death.,» *Journal of Neurochemistry*, τόμ. 5, αρ. 109, pp. 1348-62, Jun 2009.
- [88] Xilouri M. et al., «Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy.,» *PLoS One*, τόμ. 5, αρ. 4, p. e5515, 2009.
- [89] Wikipedia, the free encyclopedia, June 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Tetracycline-controlled_transcriptional_activation.
- [90] Wikipedia, the free encyclopedia, September 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Doxycycline>.
- [91] Wikipedia, the free encyclopedia, August 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Apoptosis>.
- [92] Wikipedia, the free encyclopedia, «DNA laddering,» Μάρτιος 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: laddering.
- [93] Wikipedia, the free encyclopedia, September 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Beta_sheet.
- [94] Wikipedia, the free encyclopedia, July 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Thioflavin>.
- [95] Cappai R. et al., «Dopamine promotes alpha-synuclein aggregation into SDS-resistant

- soluble oligomers via a distinct folding pathway.,» *FASEB*, τόμ. 19, αρ. 10, pp. 1377-9, August 005.
- [96] Xilouri M. και Stefanis L., «Autophagic pathways in Parkinson disease and related disorders.,» *Expert reviews in molecular medicine*, p. 13:e8, Mar 2011.
- [97] Wikipedia, the free encyclopedia, «RNA interference,» Aug 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/RNA_interference.
- [98] Martinez-Vicente M. et al., «Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy.,» *The Journal of clinical investigation*, τόμ. 2, αρ. 118, pp. 777-88, Feb 2008.
- [99] Wikipedia, the free encyclopedia, «Autophagy,» Sep 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Autophagy>.
- [100] M. Chiara Maiuri et al., «Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis,» *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, αρ. 8, pp. 741-752, Sep 2007.
- [101] K. Vekrellis, G. Minakaki και E. Emmanouilidou, «Effects of Alpha-Synuclein on Cellular Homeostasis,» σε *Etiology and Pathophysiology of Parkinson's Disease*, InTech, 2011.
- [102] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Ubiquitin>.
- [103] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/Proteasome>.
- [104] E. Emmanouilidou, L. Stefanis και K. Vekrellis, «Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome.,» *Neurobiol Aging*, τόμ. 31, αρ. 6, pp. 953-68, June 2010.
- [105] K. Danzer, «Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding.,» *J Neurosci*, τόμ. 27, αρ. 34, pp. 9220-32, August 2007.
- [106] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available:

http://en.wikipedia.org/wiki/Membrane_potential.

- [107] Emmanouilidou E. et al., «Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival.,» *J Neurosci.*, τόμ. 30, αρ. 20, pp. 6838-51, May 2010.
- [108] Lee HJ et al., «Dopamine promotes formation and secretion of non-fibrillar alpha-synuclein oligomers.,» *Exp Mol Med*, τόμ. 43, αρ. 4, pp. 216-22, Apr 2011.
- [109] Funahashi A. et al., «CellDesigner: a process diagram editor for gene-regulatory and biochemical networks.,» *BIOSILICO*, αρ. 1, pp. 159-162, 2003 .
- [110] Funahashi A. et al., «CellDesigner 3.5: A Versatile Modeling Tool for Biochemical Networks.,» *Proceedings of the IEEE*, τόμ. 96, αρ. 8, pp. 1254 - 126, Aug 2008.
- [111] Proctor CJ. et al., «Modelling the role of UCH-L1 on protein aggregation in age-related neurodegeneration.,» *PLoS One*, τόμ. 5, αρ. 10, p. e13175, Oct 2010.
- [112] Wikipedia, the free encyclopedia, Oct 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Western_blot.
- [113] Wikipedia, the free encyclopedia, Sep 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry.
- [114] Wikipedia, the free encyclopedia, Oct 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Atomic_mass_unit.
- [115] R. de la Fuente-Fernandez et al., «The role of the Lewy body in idiopathic Parkinsonism.,» *Parkinsonism & Related Disorders*, τόμ. 4, αρ. 2, pp. 73-77 , August 1998.
- [116] M. L. Kramer και W. . J. Schulz-Schaeffer, «Presynaptic α -Synuclein Aggregates, Not Lewy Bodies, Cause Neurodegeneration in Dementia with Lewy Bodies.,» *The Journal of Neuroscience*, pp. 1405-1410, February 2007.
- [117] L. A. Volpicelli-Daley, «Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death.,» *Neuron*, τόμ. 72, αρ. 1, pp. 57-71,

October 2011.

- [118] Paula Desplats et al., «Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of α -synuclein,» *PNAS*, τόμ. 106, αρ. 31, pp. 13010-5, August 2009.
- [119] Wikipedia, the free encyclopedia, July 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Markov_process.
- [120] S. K. Poovathingal και R. Gunawan, «Global parameter estimation methods for stochastic biochemical systems,» *BMC Bioinformatics 2010*, τόμ. 11, αρ. 414, 2010.
- [121] Wikipedia, the free encyclopedia, July 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Differential_evolution.
- [122] A. Horváth και D. Manini, «Parameter Estimation of Kinetic Rates in Stochastic Reaction Networks by the EM Method,» *BMEI '08 Proceedings of the 2008 International Conference on BioMedical Engineering and Informatics*, τόμ. 1, 2008.
- [123] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Expectation%E2%80%93maximization_algorithm.
- [124] Wikipedia, the free encyclopedia, May 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Gaussian_filter.
- [125] Wikipedia, the free encyclopedia, October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Taylor_series.
- [126] Wikipedia, the free encyclopedia, «Brownian motion,» October 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Brownian_motion.
- [127] Christophe Andrieu et al., «An Introduction to MCMC for Machine Learning,» *Machine Learning*, τόμ. 50, αρ. 1, pp. 5-43, January 2003.
- [128] A. Golightly και D. J. Wilkinson, «Bayesian inference for nonlinear multivariate diffusion models observed with error,» *Computational Statistics & Data Analysis*, τόμ. 52, αρ. 3, January 2008.

- [129] Wikipedia, the free encyclopedia, «Gibbs sampling,» September 2011. [Ηλεκτρονικό]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Gibbs_sampling.
- [130] R. J. Boys, D. J. Wilkinson και L. K. T.B., «Bayesian inference for a discretely observed stochastic kinetic model,» *Statistics and Computing*, τόμ. 18, αρ. 2, pp. 125-135, 2007.