Ανάπτυξη στοχαστικού μαθηματικού μοντέλου για την προσομοίωση πειραμάτων ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτολεύκανση με σκοπό την μελέτη των κινητικών ιδιοτήτων σημασμένων πρωτεϊνών

Δ. Γκλώτσος[1] Ε. Αθανασιάδης[1], Π. Γεωργιάδης[1], Ι. Καλατζής[1], Κ. Σιδηρόπουλος[1], Κ. Νίνος[1], Δ. Κάβουρας[1]

[1]*Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα (Τ.Ε.Ι.) Αθήνας, Τμήμα Τεχνολογίας Ιατρικών Οργάνων (dimglo@teiath.gr)*

***Λέξεις κλειδιά**: FRAP, ανάκτηση φθορισμού, στοχαστικό μοντέλο*

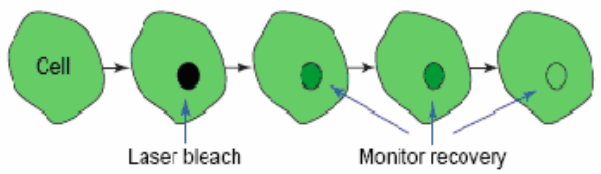
Περίληψη: Ο σκοπός αυτής της μελέτης είναι ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη στοχαστικού μαθηματικού μοντέλου για την προσομοίωση πειραμάτων ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (Fluorescence Recovery After Photobleaching ή FRAP) με στόχο την διερεύνηση των κινητικών ιδιοτήτων σημασμένων πρωτεϊνών.

Ι. Εισαγωγή

Όλοι οι βιολογικοί φθορίζοντες σημαντές (fluorescence dyes) εκπέμπουν φως συγκεκριμένου μήκους κύματος όταν διεγερθούν από υπεριώδη ακτινοβολία. Αν η διέγερση πραγματοποιηθεί με χρήση φωτός υψηλής εντάσεως, τότε εμφανίζεται το φαινόμενο της λεγόμενης 'φωτολεύκανσης' (photobleaching), της αναστολής δηλαδή της φθορίζουσας ιδιότητας των σημαντών [1]. Το φαινόμενο αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου πρωτεϊνικής απεικόνισης, της λεγόμενης ανάκτησης φθορισμού μετά από φωτολεύκανση (Fluorescence Recovery After Photobleaching ή FRAP) [2]. Η χρήση της μεθόδου αυτής καθιστά δυνατή την δυναμική μελέτη της ικανότητας πρωτεϊνικών μορίων να κινούνται στο χώρο και στον χρόνο [3-5].

Το πρωτόκολλο ενός πειράματος FRAP περιλαμβάνει τρεις σημαντικές διεργασίες: σήμανση, φωτολεύκανση, και ανάκτηση φθορισμού. Σήμανση: Εκτός από λίγες εξαιρέσεις οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι άχρωμες με αποτέλεσμα να είναι αδύνατη η παρατήρησή τους στο μικροσκόπιο. Γι' αυτό τον λόγο πριν από κάθε πείραμα FRAP οι πρωτεΐνες σημαίνονται με κάποια φθορίζουσα ουσία, συνήθως την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (Green Fluorescent Protein ή GFP) [6]. Φωτολεύκανση: Αφού οι πρωτεΐνες έχουν σημανθεί, μια κυκλική συνήθως περιοχή ενδιαφέροντος ακτινοβολείται με laser υψηλής εντάσεως. Η ακτινοβολία προκαλεί αναστολή του φθορισμού στην περιοχή ενδιαφέροντος, η οποία πλέον εμφανίζεται σκοτεινή σε αντίθεση με τις μη-ακτινοβολημένες περιοχές (εικ. 1). Ανάκτηση φθορισμού: Αν οι πρωτεΐνες δεν κινούνταν τότε η περιοχή φωτολεύκανσης θα παρέμενε σκοτεινή με την πάροδο του χρόνου. Αλλά λόγω της κινητικότητας τους η περιοχή φωτολεύκανσης καθίστανται σταδιακά ξανά φθορίζουσα. Ο ρυθμός της ανάκτησης (recovery) του φθορισμού (εικ. 2) κωδικοποιεί όλη την απαραίτητη πληροφορία αυτής της κινητικότητας, η οποία συνοψίζεται σε μία μόνο καμπύλη, την λεγόμενη καμπύλη ανάκτησης φθορισμού (recovery curve) [7].

Η τεχνική FRAP έχει προταθεί εδώ και τρεις δεκαετίες περίπου [2], αλλά μόνο τα τελευταία χρόνια άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως ακολουθώντας την ραγδαία εξέλιξη των συνεστιακών μικροσκοπίων (confocal microscopy) [8] και της πρωτεομικής (proteomics), που έχει αναδείξει νέους ορίζοντες στην μελέτη των πρωτεϊνών [8-11].



Εικόνα 1: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής FRAP [13]

Σύμφωνα με το πιο δημοφιλές μαθηματικό μοντέλο ανάλυσης πειραμάτων FRAP [14], τα φθορίζοντα μόρια έχουν την δυνατότητα είτε να διαχυθούν ελεύθερα μέσα στο κύτταρο, είτε να αντιδράσουν αμφίδρομα και αντιστρεπτά με ειδικές ακινητοποιημένες θέσεις προσδέσεως (binding sites). Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να εκφραστεί με ένα σετ συζευγμένων εξισώσεων αντίδρασης-διάχυσης (Εξίσωση 1-2), οι οποίες προσδιορίζονται από τον συντελεστή διάχυσης D, τους συντελεστές αντιδράσεων k_{on} και k_{off}, την συγκέντρωση των ελευθέρων φθοριζόντων μορίων F και την συγκέντρωση των προσδεμένων ακίνητων συμπλεγμάτων FS [14]. Όπου k_{on} είναι ο συντελεστής που περιγράφει την 'τάση' των ελευθέρων φθοριζόντων μορίων F να αντιδράσουν με τις ειδικές ακινητοποιημένες θέσεις προσδέσεως S και k_{off} είναι ο συντελεστής που περιγράφει την 'τάση' των σχηματισμένων συμπλεγμάτων FS να διασπώνται σε ελευθέρα φθορίζοντα μόρια F και σε ακινητοποιημένες θέσεις προσδέσεως S.

$$F + S \underset{koff}{\overset{kon}{\rightleftharpoons}} FS \qquad (1)$$

$$\frac{\partial f}{\partial t} = D\nabla^2 f - k_{on} f + k_{off} fs$$

$$\frac{\partial fs}{\partial t} = k_{on} f - k_{off} fs \qquad (2)$$

Πειραματικά δεδομένα μπορούν κατόπιν να προσαρμοστούν στις προβλέψεις του μοντέλου που περιγράφηκε παραπάνω έτσι ώστε να εκτιμηθεί ο

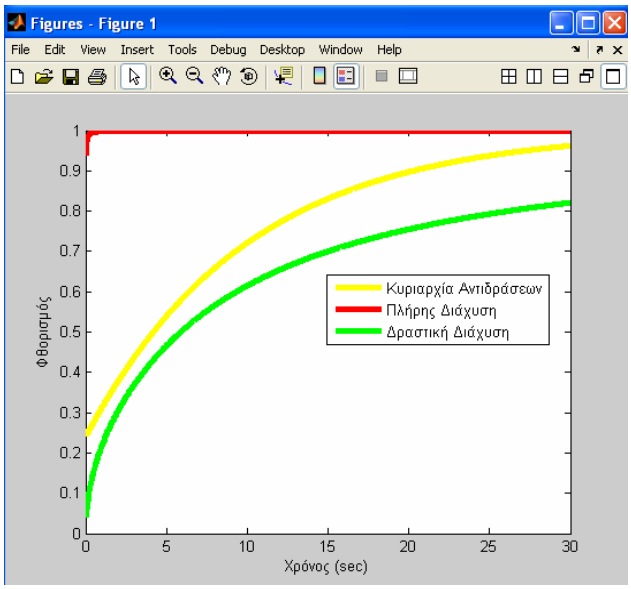
συντελεστής διάχυσης D και ο λόγος των συντελεστών αντιδράσεως k_{on} και k_{off} των υπό μελέτη πρωτεϊνών. Η ανάλυση αυτή μπορεί να οδηγήσει στις εξής τρεις διαφορετικές προβλέψεις (εικ. 2):

Μοντέλο 1: *Πλήρης Διάχυση (Pure Diffusion)*: όλες οι φθορίζοντες πρωτεΐνες είναι ελεύθερες και η ανάκτηση, που οφείλεται κυρίως στην διάχυση, περιγράφεται από τον συντελεστή διάχυσης D.

Μοντέλο 2: *Δραστική Διάχυση (Effective Diffusion)*: οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται τόσο γρήγορα με αποτέλεσμα να μην μπορούν να παρατηρηθούν στην καμπύλη ανάκτησης. Η ανάκτηση συμπεριφέρεται σαν μια καθυστερημένη διαδικασία διάχυσης και μπορεί να περιγραφεί από τον δραστικό συντελεστή διάχυσης D_{eff}.

Μοντέλο 3: *Κυριαρχία Αντιδράσεων (Reaction Dominant)*: η διάχυση πραγματοποιείται πιο γρήγορα από τις αντιδράσεις. Η ανάκτηση επηρεάζεται κυρίως από τους συντελεστές αντιδράσεως k_{on} και k_{off}.

Αυτό το μοντέλο εξισώσεων (Εξίσωση 2) είναι ευρέως αποδεκτό στην διεθνή βιβλιογραφία και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προβλέψει την ανάκτηση φθορισμού (F+FS) ως προς τον χώρο και χρόνο.



Εικόνα 2: Μοντέλα περιγραφής καμπύλης ανακτήσεως

Παρόλα αυτά το μοντέλο αυτό έχει μερικούς σημαντικούς περιορισμούς και πολλές δυνατότητες επέκτασης καθώς [14]: (α) *Μπορεί να υπολογίσει μόνο το λόγο των συντελεστών αντιδράσεως* $\frac{\text{kon}}{\text{koff}}$ ο οποίος όμως μας δίνει άπειρες λύσεις για τις συγκεκριμένες τιμές των k_{on} και k_{off}. Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό περιορισμό για την ακριβή πρόβλεψη, αναγνώριση και μελέτη των ιδιοτήτων των ειδικών ακινητοποιημένων θέσεων προσδέσεως S. (β) *Ισχύει μόνο για κυκλικές περιοχές φωτολεύκανσης*. Για άλλες γεωμετρικές διατάξεις ο μαθηματικός φορμαλισμός αλλάζει [13]. (γ) *Δεν μπορεί να περιγράψει* την επαναφορά του συστήματος στην *κατάσταση ισορροπίας*. Δηλαδή αν διαταράξουμε την ισορροπία του συστήματος προκαλώντας για παράδειγμα την εισαγωγή σημασμένων πρωτεϊνών στο υπό μελέτη βιολογικό περιβάλλον δεν γνωρίζουμε πότε και πως το σύστημα ανακτά την κατάσταση ισορροπίας. (δ) Οι συντελεστές αντιδράσεως k_{on} και k_{off} θεωρούνται σταθεροί ως προς τον χώρο και χρόνο. Το ίδιο και ο συντελεστής διαχύσεως D. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα *να είναι εξαιρετικά δύσκολη η μελέτη περιπτώσεων* που σχηματίζονται για παράδειγμα *συσσωματώματα πρωτεϊνών*. Στην περίπτωση αυτή οι συντελεστές αυτοί έχει αποδειχθεί ότι μεταβάλλονται στον χώρο και χρόνο [15]. (ε) Ο χρόνος που χρειάζεται για την επόμενη διάχυση ή αντίδραση θεωρείται σταθερός, αυτό όμως *δεν μπορεί να περιγράψει παρά μόνο την μέση συμπεριφορά των φαινομένων* και δεν μπορεί να περιγράψει τις μεταβολές στον μοριακό πληθυσμό [16].

Ο σκοπός της μελέτης αυτής είναι ο σχεδιασμός και η ανάπτυξη στοχαστικού μαθηματικού μοντέλου για την προσομοίωση πειραμάτων FRAP με στόχο την διερεύνηση των κινητικών ιδιοτήτων σημασμένων πρωτεϊνών. Παρόλο που έχει τονιστεί η χρησιμότητα των στοχαστικών προσεγγίσεων στην μελέτη βιολογικών συστημάτων [16-20], δεν έχει εξεταστεί ακόμα στην διεθνή βιβλιογραφία αντίστοιχη στοχαστική προσέγγιση στην περίπτωση της FRAP. Μια τέτοια προσέγγιση αναμένεται να οδηγήσει σε λεπτομερέστερη ανάλυση των κινητικών και αντιδραστικών πρωτεϊνικών ιδιοτήτων

ΙΙ. Μέθοδος

Αναπτύχθηκε μοντέλο διάχυσης των σημασμένων φθοριζόντων πρωτεϊνών στο κυτταρικό περιβάλλον. Η διάχυση θεωρείται ως διεργασία κίνησης τύπου Brownian [21]. Το μοντέλο θα υποθέτει ότι οι πρωτεΐνες κινούνται τυχαία στον χώρο και στον χρόνο με πιθανότητα $P(r,t) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{d/2}} \exp(\frac{-r^2}{4DT})$, όπου r είναι η μετατόπιση, t ο χρόνος, D ο συντελεστής διαχύσεως, d η διάσταση του γεωμετρικού χώρου.

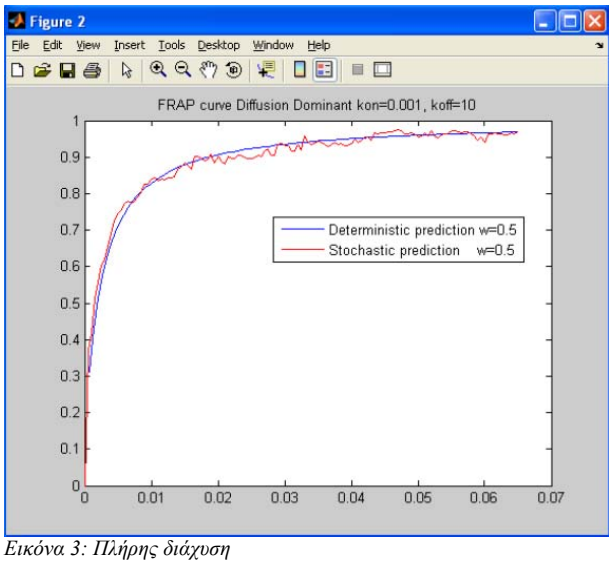
Κατόπιν, αναπτύχθηκε το μοντέλο αντιδράσεως των φθοριζόντων πρωτεϊνών F με ενός τύπου ειδικές ακινητοποιημένες θέσεις προσδέσεως S σύμφωνα με την αντίδραση $F + S \underset{koff}{\overset{kon}{\rightleftharpoons}} FS$. Η μέθοδος βασίζεται στον αλγόριθμο Gillespie που χρησιμοποιεί μεθοδολογίες Monte Carlo για να προσδιορίσει το πιο πιθανό από τα ακόλουθα δύο ενδεχόμενα: να συμβεί μία αντίδραση ή να συμβεί μία διάσπαση με πιθανότητα $P_0(\tau) = \exp(-\sum_{\nu=1}^{M} a_\nu \tau)$. Όπου M είναι ο τύπος αντίδρασης, α είναι η κλήση του συστήματος προς μία συγκεκριμένη αντίδραση ή διάσπαση, και τ είναι το χρονικό διάστημα μέχρι το επόμενο γεγονός. Επιπροσθέτως, με βάση τη θεωρία του αλγορίθμου Gillespie δύναται να απαντηθούν και άλλα σημαντικά ερωτήματα όπως μετά από πόσο χρόνο θα συμβεί η επόμενη αντίδραση-διάσπαση, και ποια θα είναι η αλλαγή των μοριακών πληθυσμών μετά από την αντίδραση ή την διάσπαση [22].

Για την ενοποίηση του μοντέλου διαχύσεως και του μοντέλου αντιδράσεων θεωρήθηκε ότι η διάχυση

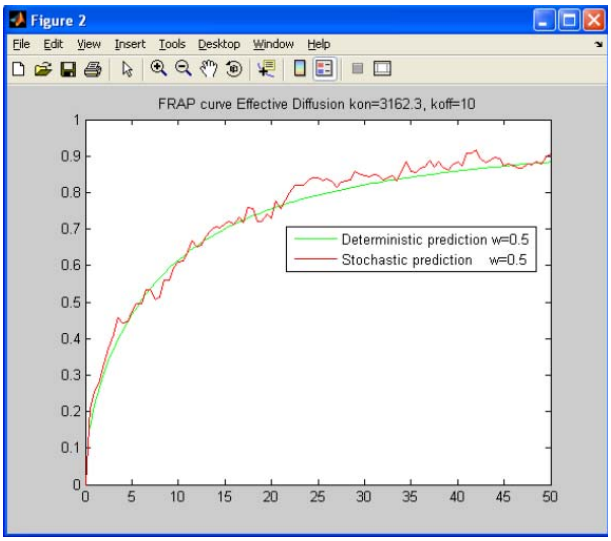
αποτελεί μια εικονική αντίδραση. Έτσι η μέθοδος του Gillespie θα τροποποιηθεί ώστε να υπολογίζει το πιο πιθανό από τα ακόλουθα τρία ενδεχόμενα, δηλαδή ποια είναι η πιθανότητα να συμβεί μία αντίδραση, ποια είναι η πιθανότητα να συμβεί μία διάσπαση και τέλος ποια είναι η πιθανότητα να συμβεί μία διάχυση.
Το στοχαστικό μοντέλο συγκρίθηκε με τα deterministic μοντέλα [14] που έχουν προταθεί στην διεθνή βιβλιογραφία ως προς την συμπεριφορά του σε περιπτώσεις πλήρης διαχύσεως, δραστικής διαχύσεως και κυριαρχίας αντιδράσεων. Θα εξεταστούν τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα του προτεινόμενου στοχαστικού μοντέλου.

III. Αποτελέσματα – Συμπεράσματα

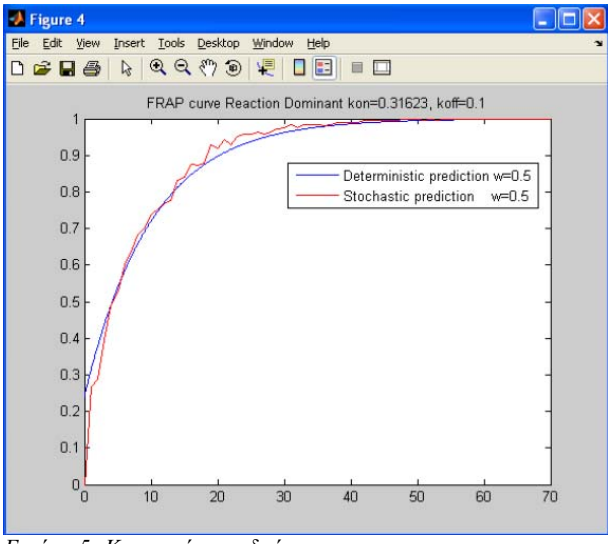
Η εικόνες 3-5 δείχνουν την συμπεριφορά του στοχαστικού μοντέλου σε σύγκριση με το ντετερμινιστικό μοντέλο για τις 3 διαφορετικές περιπτώσεις (*Πλήρης Διάχυση, Δραστική Διάχυση, και Κυριαρχία Αντιδράσεων*). Με την χρήση του προτεινόμενου μοντέλου δύναται η μελέτη της κατάστασης ισορροπίας των πρωτεϊνών ενδιαφέροντος (εικ. 6). Η εικόνα 7 παρουσιάζει επιμέρους πληροφορίες που μπορούμε να εξάγουμε με την χρήση του στοχαστικού μοντέλου στην περίπτωση της Πλήρους Διαχύσεως. Τα αποτελέσματα δείχνουν πολύ καλή συμφωνία μεταξύ του προτεινόμενου στοχαστικού και του ντετερμινιστικού μοντέλου. Επίσης δύναται ο προσδιορισμό τάξης μεγέθους του χρονικού διαστήματος μέχρι την επόμενη διάχυση ή μέχρι την επόμενη αντίδραση καθώς και η μελέτη των δυναμικών μεταβολών στον μοριακό πληθυσμό στον χρόνο και τον χώρο. Με αυτό τον τρόπο είναι εφικτή η λεπτομερέστερη ανάλυση των ιδιοτήτων των ακινητοποιημένων θέσεων προσδέσεως S καθώς και η αναγνώριση των βιοχημικών μονοπατιών των πρωτεϊνών υπό μελέτη.



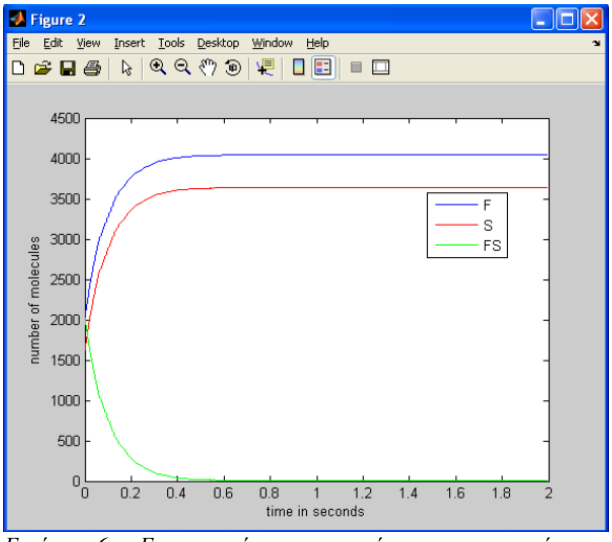
Εικόνα 3: Πλήρης διάχυση



Εικόνα 4: Δραστική διάχυση



Εικόνα 5: Κυριαρχία αντιδράσεων



Εικόνα 6: Επαναφορά του συστήματος σε κατάσταση ισορροπίας

Reaction coefficients	$k_{on} = 10^{-2}$ sec^{-1} $k_{off} = 10^{1}$ sec^{-1}	
Sampling step	0.0005 sec	(time step that the FRAP curve was sampled)
Starting Concentrations for each compartment	[F] = 0.041513 nM [S] = 0.033211 nM [FS] = 0.041513 nM	In a reaction volume of V=10pl
Total starting concentrations	[F] = 3.3626 nM [S] = 2.6901 nM [FS] = 3.3626 nM	$concentration = \frac{CountOfMolecules_i * 1e9}{V * Avogadro * 1e-9}(nM)$, i denotes the different chemical species
Reaction Volume	V = 10 pl	
Recovery prediction	<u>*Radius=0.5 μm*</u>: 0.0082 sec <u>*Radius=1.1 μm*</u>: 0.43 sec	(time needed for 80% recovery)
Mean distance per sampling step	0.18424 μm	(the mean distance that a diffusing particle covers every sampling step)
Reaction equilibrium	≈0.6 sec	Time that Reaction Equilibrium is reached for any possible starting population considering volume V is fixed

Εικόνα 7: Ιδιότητες πρωτεϊνών σε μοντέλο Πλήρους Διαχύσεως

IV. Ευχαριστίες

Η μελέτη χρηματοδοτείται από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ) στα πλαίσια του προγράμματος Υποτροφιών Μεταδιδακτορικής Έρευνας.

V. Αναφορές

[1] J. Lippincott-Schwartz, N. Altan-Bonnet, and G. H. Patterson, "Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells," *Nat Cell Biol*, vol. Suppl, pp. S7-14, 2003.

[2] D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W. W. Webb, "Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics," *Biophys J*, vol. 16, pp. 1055-69, 1976.

[3] N. Y. Sidorova, S. Muradymov, and D. C. Rau, "Trapping DNA-protein binding reactions with neutral osmolytes for the analysis by gel mobility shift and self-cleavage assays," *Nucleic Acids Res*, vol. 33, pp. 5145-55, 2005.

[4] S. Ainsworth and W. S. Bingham, "Reactions of partially oxidised hemoglobin solutons. II. A matrix rank analysis of the initial rate of binding carbon monoxide," *Biochim Biophys Acta*, vol. 160, pp. 10-7, 1968.

[5] T. Hardingham and P. Gribbon, "Confocal-FRAP analysis of ECM molecular interactions," *Methods Mol Biol*, vol. 139, pp. 83-93, 2000.

[6] T. J. Pucadyil and A. Chattopadhyay, "Confocal fluorescence recovery after photobleaching of green fluorescent protein in solution," *J Fluoresc*, vol. 16, pp. 87-94, 2006.

[7] G. Carrero, D. McDonald, E. Crawford, G. de Vries, and M. J. Hendzel, "Using FRAP and mathematical modeling to determine the in vivo kinetics of nuclear proteins," *Methods*, vol. 29, pp. 14-28, 2003.

[8] J. L. Howell and R. Truant, "Live-cell nucleocytoplasmic protein shuttle assay utilizing laser confocal microscopy and FRAP," *Biotechniques*, vol. 32, pp. 80-2, 84, 86-7, 2002.

[9] K. J. Edson, S. S. Lim, G. G. Borisy, and P. C. Letourneau, "FRAP analysis of the stability of the microtubule population along the neurites of chick sensory neurons," *Cell Motil Cytoskeleton*, vol. 25, pp. 59-72, 1993.

[10] C. W. Mullineaux, "FRAP analysis of photosynthetic membranes," *J Exp Bot*, vol. 55, pp. 1207-11, 2004.

[11] F. Waharte, C. M. Brown, S. Coscoy, E. Coudrier, and F. Amblard, "A two-photon FRAP analysis of the cytoskeleton dynamics in the microvilli of intestinal cells," *Biophys J*, vol. 88, pp. 1467-78, 2005.

[12] K. M. Wright, N. T. Wood, A. G. Roberts, S. Chapman, P. Boevink, K. M. Mackenzie, and K. J. Oparka, "Targeting of TMV Movement Protein to Plasmodesmata Requires the Actin/ER Network; Evidence From FRAP," *Traffic*, 2006.

[13] B. L. Sprague and J. G. McNally, "FRAP analysis of binding: proper and fitting," *Trends Cell Biol*, vol. 15, pp. 84-91, 2005.

[14] B. L. Sprague, R. L. Pego, D. A. Stavreva, and J. G. McNally, "Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching," *Biophys J*, vol. 86, pp. 3473-95, 2004.

[15] S. Kim, E. A. Nollen, K. Kitagawa, V. P. Bindokas, and R. I. Morimoto, "Polyglutamine protein aggregates are dynamic," *Nat Cell Biol*, vol. 4, pp. 826-31, 2002.

[16] T. C. Meng, S. Somani, and P. Dhar, "Modeling and simulation of biological systems with stochasticity," *In Silico Biol*, vol. 4, pp. 293-309, 2004.

[17] P. Seghieri, C. Dussert, J. Palmari, Y. Berthois, P. M. Martin, and C. Penel, "A minimal model for calcium signal generated by tyrosine kinase and G protein linked receptors; a stochastic computer simulation with CALSIM," *Int J Med Inform*, vol. 46, pp. 53-65, 1997.

[18] C. J. Brokaw, "Protein-protein ratchets: stochastic simulation and application to processive enzymes," *Biophys J*, vol. 81, pp. 1333-44, 2001.

[19] M. S. Apaydin, C. E. Guestrin, C. Varma, D. L. Brutlag, and J. C. Latombe, "Stochastic roadmap simulation for the study of ligand-protein interactions," *Bioinformatics*, vol. 18 Suppl 2, pp. S18-26, 2002.

[20] M. Begusova, S. Giliberto, J. Gras, D. Sy, M. Charlier, and M. Spotheim-Maurizot, "DNA radiolysis in DNA-protein complexes: a stochastic simulation of attack by hydroxyl radicals," *Int J Radiat Biol*, vol. 79, pp. 385-91, 2003.

[21] D. Freedman, *Brownian motion and diffusion*. New York: Springer-Verlag, 1983.

[22] J. H. Gillespie, "Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions," *Journal of Physical Chemistry*, vol. 81, pp. 2340-61, 1972