

Construction and Comparison of RNA Interference Models Using Petri Net

*通訊作者：*achen@mail.tcu.edu.tw*

當病毒基因、人工轉入基因等外源性基因隨機進到宿主體內，並利用宿主細胞進行轉錄時，常產生雙鏈 RNA 分子(double-stranded RNA, dsRNA)，或生物體自身基因轉錄後生成異常 mRNA 被自體免疫系統識別後，會激活體內的核酸內切酶 Dicer 將 dsRNA/異常 RNA 切割成多個具有特定長度(大約 21~25bp)和結構的小片段干擾性 RNAs(small interfering RNAs, siRNAs) [11]。各種生物體內 Dicer 結構略有不同，致使 siRNAs 長度存在微小差別。

siRNA 在體內 RNA 解旋酶的作用下解鏈成 sense 和 antisense RNA 兩股，而後 antisense 再和體內的內切酶、解旋酶等酵素結合形成 RNA 誘導的沉默複合物(RNA-induced silencing complex, RISC)[5]，啟動 RNAi 途徑。RISC 中負責 target 序列識別作用的 siRNA antisense，經鹼基互補配對與 target mRNA 結合，使其降解(degradation)，從而導致特定基因沉默[6]。RNAi 過程中的關鍵物質被認為是 siRNA。在一些不表現 RNAi 現象的植物體內檢測不到任何的 siRNAs。因此認為 siRNAs 是啟動 RNAi 途徑的起始物，被稱為 trigger siRNA，可作為 guide RNA 與 Target mRNA 結合[4]。所以從 RNAi 的生物理論，可知 RNA 干擾是對抗病毒感染、複製最有利的方式。比起傳統基因療法，設計上更為簡單、作用迅速。而我們利用 Petri Nets 建構模型，分析資料。可節省生理實驗所需花費的時間與物力。幫助改進生理實驗結果，作為數據參考。進一步探討並驗證生物路徑實際存在的活動。

Petri Nets 又稱為 Hybrid Functional Petri Nets (HFPN)，發展源自 1962 年 Carl A. Petri 的博士論文。是一種類似網路圖形並具有數學理論的建構模型工具。可廣泛應用於許多領域上或以圖形呈現系統，而最早將 Petri nets 技術運用在建構生物路徑的模型是 Reddy *et al.* (1993)[9]。

Petri Nets 自 1962 年後於每個階段改良其功能。1979 年的階層性派翠網 (Hierarchical Petri Nets) [11]。1991 年的複合型派翠網(Hybrid Petri Nets)允許連續值和離散值之間表現明確的關係，離散值可保持其特性[1]。至近年發展的延伸混合功能型派翠網(Hybrid Functional Petri Nets with Extension; HFPNe)改善離散值和連續值之間的應用，增加 boolean, string 等型態的功能[3]。

二、研究方法

2.1 Hybrid Functional Petri Net

我們運用一套軟體工具—Genomic Object Net，是利用 HFPN 的技術來發展模擬生物途徑。Genomic Object Net 可顯示出模擬生物途徑的高性能視覺化建模架構。Petri nets 基本元件圖形，如 Figure 2 所示：

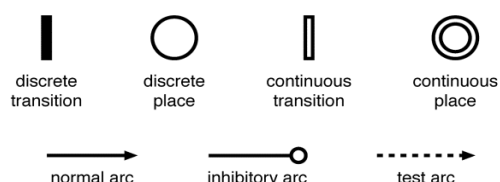


Figure 2、Petri Net 中，主要的四個元素：Place、Transition、Arc、Token[14]

1. Place (entity): 表示基因、蛋白質等。
2. Transition (process): 表示進行化學反應的過程。
3. Arc (connector): 表示反應移動的路徑。
4. Token (markings): 表示反應的濃度。

依上述四種元件，結合參數值與微分方程式，即可架構出網路模型，如 Figure 3：

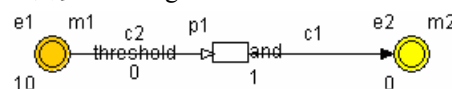


Figure 3、此圖為基本網路圖，m1 在每單位時間透過中間的 Transition 將反應值傳送到 m2，以完成反應路徑。

2.2、本研究流程圖

RNA 干擾機制流程圖

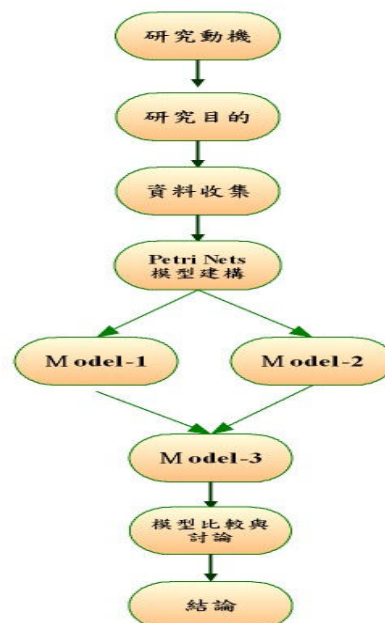


Figure 4、研究流程圖

在確立研究動機和目的後，開始收集 RNA 干擾機制的相關資料，研究 Petri Nets 技術與軟體。依據我們所看的文獻資料，整合架構出模型 1 與模型 2，進一步將其改良、結合為模型 3，比較三種模型的差異，分析其結果，並討論此模型之未來應用與發展。

三、RNA 干擾機制模型的建構

Figure 5 為 RNA 干擾機制圖，其包含下列步驟：

1. dsRNA 視為一個啟動機制的訊號，利用 Dicer 將 dsRNA 切割成 siRNA。
2. siRNA 和蛋白質們結合，形成 RISC 複合體。
3. RISC 再去和 target mRNA binding，變成 complex。
4. (a) 從 complex 再去合成 dsRNA。
(b) target mRNA 被 degradation。

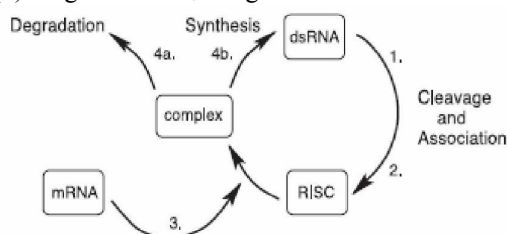


Figure 5、基本 RNA 干擾機制圖[2]

3.1、Model-1：基本 RNA 干擾機制模型

根據 Figure 5，所建構出的微分方程式：

$$Ds'(t) = -a * Ds(t) + g * C(t) \quad (1)$$

$$R'(t) = a * n * Ds(t) - d_R * R(t) - b * R(t) * T(t) \quad (2)$$

$$C'(t) = b * R(t) * T(t) - (g + d_C) * C(t) \quad (3)$$

$$T'(t) = h - d_M * T(t) - b * R(t) * T(t) \quad (4)$$

分別表示為：

$Ds(t)$ ：dsRNA (m_1)，dsRNA 的消耗率為 $a * Ds(t)$ ；藉由 RdRp 重新合成 dsRNA，表示為 $g * C(t)$ 。

$R(t)$ ：siRNA-RISC (m_6)， m_6 的生成率為 $a * n * D(t)$ ， n 是指每 dsRNA 分子經由 Dicer 切割產生 siRNA 的平均數量。 m_6 的降解率為 $d_R * R(t)$ ，而 $b * R(t) * M(t)$ 表示 m_6 與 mRNA 結合，合成 $C(t)$ 。

$C(t)$ ：RISC-mRNA complex (m_3)， $b * R(t) * M(t)$ 表示 siRNA-RISC 和 mRNA 形成複合物的生成率。dsRNA 合成率和複合物降解率分別為 $g * C(t)$ 、 $d_C * C(t)$ 。

$T(t)$ ：mRNA (m_7)，mRNA 的生成率為 h ，降解率為 $d_M * T(t)$ 。依據 mass-action kinetics，mRNA 與 m_6 結合形成複合物，其耗損率為 $b * R(t) * M(t)$ 。

在 Table 1 中，我們提供參數屬性；在 Table 2 中，提供觸發條件和路徑屬性，來完成基本 RNA 干擾機制模型的建構。

Table 1. model-1 中的每一元件的屬性

(單位：量/單位時間)

Name	Type	Variable	Initial Value
dsRNA	Double	m_1	10
RISC_monomer	Double	m_2	100
siRNA - RISC - mRNA complex	Double	m_3	0
mRNA nuclei	Double	m_4	1000
siRNA	Double	m_5	0
siRNA - RISC complex	Double	m_6	0
mRNA cytoplasm	Double	m_7	0
Rate of dsRNA cleavage	Double	a	10
Number of siRNAs cleaved from one dsRNA	Double	n	5
Decay rate of siRNA - RISC complex	Double	d_r	0.1
Decay rate of siRNA - RISC - mRNA complex	Double	d_c	1
Decay rate of mRNA	Double	d_m	1
Rate of RISC - siRNA - mRNA complex formation	Double	b	0.001
Unprimed amplification rate	Double	g	1
Rate of mRNA synthesis	Double	h	1000
Rate of dsRNA synthesis from mRNA	Double	p	0.002

Table 2. 觸發條件和每條路徑的屬性

Name	Type	Firing Style	Kinetic Script
dsRNA cleavage	continuous	and	$a * m_1$
Dicer cleavage	continuous	and	$a * n * m_5$
Tetramerization	continuous	and	$SMass(m_2 * 0.001, 0, 0.2)$
Combination	continuous	and	$b * m_6 * m_7$
Degradation	continuous	and	$d_r * m_6$
Synthesis dsRNA	continuous	and	$p * m_7$
Unprimed amplification	continuous	and	$g * m_3$
Translocation	continuous	and	100
Degradation	continuous	and	$d_m * m_7$
Degradation	continuous	and	$d_c * m_3$
Synthesis	continuous	and	h

3.2 Model-2：Raab 的 RNA 干擾機制模型

根據 Raab 的論文[10]所建構出的微分方程式：

$$D'(t) = -k_{dD} * D(t) \quad (5)$$

$$S'(t) = -k_{dR} * S(t) \quad (6)$$

$$T'(t) = k_{TS} * D(t) - k_{Td} * T(t) - k_{TR} * S(t) * T(t) \quad (7)$$

$$P'(t) = k_{PS} * T(t) - k_{Pd} * P(t) \quad (8)$$

分別表示為：

D : template DNA (m1)

S : transfect siRNA (m2)

T : mRNA transcript (m3)

P : protein (m4)

在Table 3中，我們提供參數屬性；在Table 4中，提供觸發條件和路徑屬性，來完成Raab的RNA干擾機制模型的建構。

Table3. model-2 中的每一元件的屬性

(單位：量/單位時間)

Name	Type	Variable	Initial Value
Template DNA	Double	m1	100
Transfect siRNA	Double	m2	10
mRNA	Double	m3	0
protein	Double	m4	0
siRNA - RISC complex	Double	m5	0
Decay rate of Template DNA	Double	KdD	0.168
Decay rate of siRNA-mRNA complex	Double	KdR	0.193
Rate of transcript synthesis mRNA	Double	Kts	3.0169
Decay rate of mRNA	Double	Ktd	0.0211
Rate of RISC - siRNA - mRNA complex formation	Double	KtR	0.1667
Rate of protein synthesis	Double	KPS	0.0011
Decay rate of protein	Double	KPD	0.0004

Table 4. 觸發條件和每條路徑的屬性

Name	Type	Firing Style	Kinetic Script
Degradation	continuous	and	KdD*m1
Transcript synthesis	continuous	and	Kts*m1
Combination	continuous	and	KtR*m3*m2
Degradation	continuous	and	KdR*m2
Degradation	continuous	and	Ktd*m3
Synthesis protein	continuous	and	KPS*m3
Degradation	continuous	and	KPD*m4

3.3、Model-3：本研究設計的整合式 RNA 干擾模型

本文將上述兩個 model 的微分方程式整合在一起，所建構出的微分方程式：

$$m1'(t) = -dD*m1(t) - ts*m1(t) \quad (9)$$

$$m2'(t) = a*n*m6(t) + re*m5(t) - dR*m2(t) - b*m2(t)*m3(t) \quad (10)$$

$$m3'(t) = ts*m1(t) - tR*m2(t)*m3(t) - (PS + td)*m3(t) \quad (11)$$

$$m4'(t) = PS*m3(t) - PD*m4(t) \quad (12)$$

$$m5'(t) = tR*m2(t)*m3(t) - (g + dm + re*m5(t)) \quad (13)$$

$$m6'(t) = -a*m6(t) + p*m3 \quad (14)$$

在Table 5中，我們提供參數屬性；在Table 6中，提供觸發條件和路徑屬性，來完成整合式RNA干擾機制模型的建構。

Table5. model-3 中的每一元件的屬性

(單位：量/單位時間)

Name	Type	Variable	Initial Value
Template DNA	Double	m1	100
siRNA - RISC complex	Double	m2	0
mRNA	Double	m3	0
protein	Double	m4	0
siRNA - RISC - mRNA complex	Double	m5	0
dsRNA	Double	m6	10
siRNA	Double	m7	0
RISC monomer	Double	m8	100
Rate of dsRNA cleavage	Double	a	10
Rate of dsRNA synthesis from mRNA	Double	p	0.02
Unprimed amplification rate	Double	g	0.4
Decay rate of mRNA	Double	dm	0.3
Reuse of siRNA - RISC complex	Double	re	0.3
Decay rate of Template DNA	Double	dD	0.168
Decay rate of siRNA-mRNA complex	Double	dR	0.193
Rate of transcript synthesis mRNA	Double	ts	3.0169
Decay rate of mRNA	Double	td	0.0211
Rate of RISC - siRNA - mRNA complex formation	Double	tR	0.1667
Rate of protein synthesis	Double	PS	0.0011
Decay rate of protein	Double	PD	0.0004

Table 6. 觸發條件和每條路徑的屬性

Name	Type	Firing Style	Kinetic Script
Degradation	continuous	and	dD*m1
Transcript synthesis	continuous	and	ts*m1
Combination	continuous	and	tR*m3*m2
Degradation	continuous	and	dR*m2
Synthesis dsRNA	continuous	and	p*m3
Degradation	continuous	and	td*m3
Synthesis protein	continuous	and	PS*m3
Degradation	continuous	and	PD*m4
Reuse of siRNA - RISC complex	continuous	and	re*m5
Unprimed amplification	continuous	and	g*m5
Degradation	continuous	and	dm*m5
dsRNA cleavage	continuous	and	a*m6
Dicer cleavage	continuous	and	a*5*m6
Tetramerization	continuous	and	SMass(m8 *0.001 0,0.2)

四、結果與討論

4.1 基本 RNA 干擾機制模型的結果

Figure 6 是以 Petri Nets 為基礎，依數學式(1)~(4)建構出的基本 RNA 干擾機制模型。其中可看出，Dicer 將 dsRNA(m1)切割成 siRNA(m5)，與 RISC 結合形成 siRNA-RISC(m6)，再和 Target mRNA 互補配對形成 siRNA-RISC-mRNA complex(m3)，使 Target mRNA 降解。部分的 complex 會進行 RNA dependent RNA polymerase(RdRP)作用，重新合成新的 dsRNA，使 RNAi 效應持續，抑制 Target mRNA 的表現。

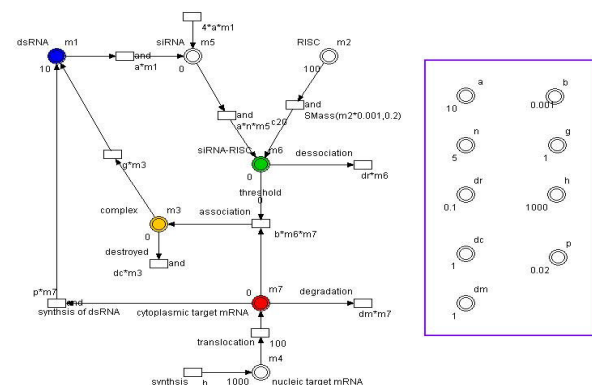


Figure 6、以 Petri Nets 為基礎，依數學式(1)~(4)建構出的基本 RNA 干擾機制模型。

Figure 6 執行後的結果為 Figure 7：

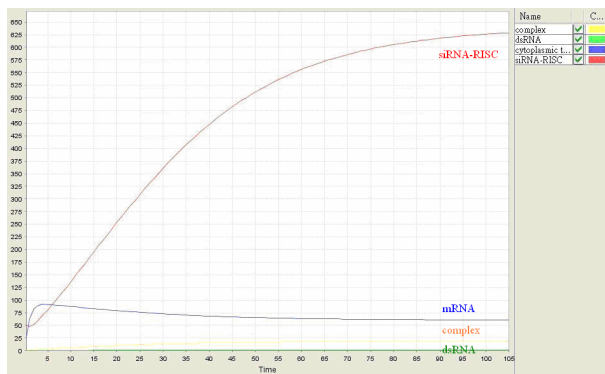


Figure 7、基本 RNA 干擾機制模型之結果圖

由 Figure 7 中可以看出 target mRNA(藍色)被漸漸降解(曲線下降)，此結果符合 RNA 干擾機制的基本現象。

4.2 Raab 的 RNA 干擾機制模型的結果

另外，根據數學式(5)~(8)，所建構出的 RNA 干擾機制模型，如 Figure 8。圖中 Template DNA (m1) 轉錄出 mRNA(m3)再轉譯成 protein(m4)，而 mRNA 會與 Transfect siRNA(m2)做結合形成 siRNA- mRNA

complex(m5)，來降解 Target mRNA。

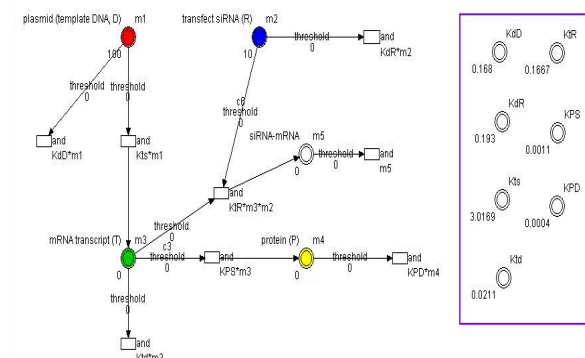


Figure 8、以 Petri Nets 為基礎，依數學式(5)~(8)建構出的 Raab 之 RNA 干擾機制模型。

Figure 8 執行後的結果為 Figure 9：

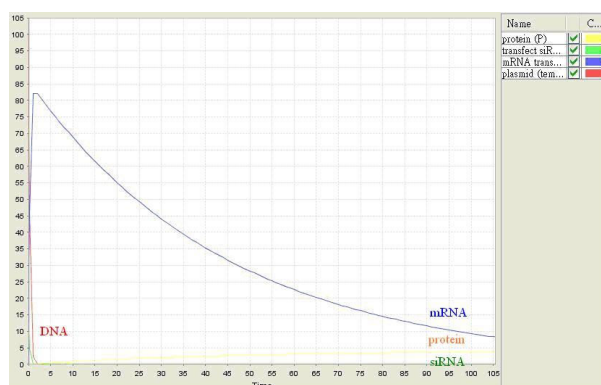


Figure 9、Raab 的 RNA 干擾機制模型之結果圖

由 Figure 9 中可明顯看出 target mRNA(藍色)的量慢慢下降了。

4.3 整合式 RNA 干擾機制模型的結果

然後我們將兩個 model 做結合，根據數學式(9)~(14)，建構出的整合式模型，如 Figure 10：

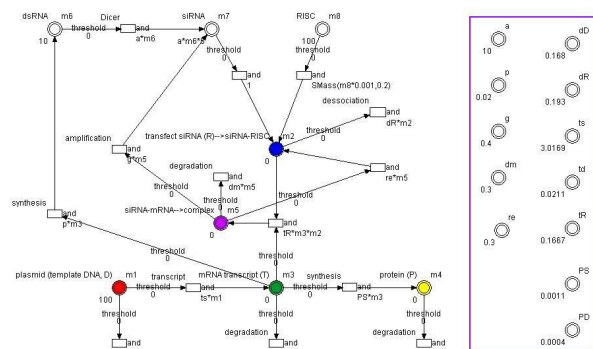


Figure 10、以 Petri Nets 為基礎，依數學式(9)~(14)建構出的整合式 RNA 干擾機制模型。

Figure 10 執行後的結果為 Figure 11 :

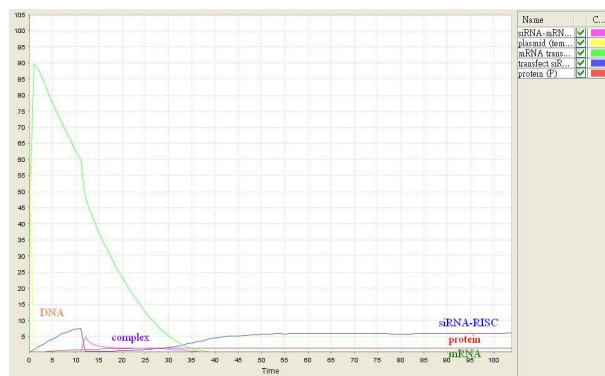


Figure 11、整合式 RNA 干擾機制模型之結果圖

由 Figure 11 可看出下述情況：

1. 有持續 RNAi 作用，抑制 mRNA 的表現。
2. 和 model-2 的結果(Figure 9)相比，其抑制 target mRNA 的速度變快了。原本要 100 多小時，加快至 30 多小時就將 target mRNA degradation 了，更符合大多數的實驗室結果。

五、結論

本文利用 Petri Net 技術建構一個整合式 RNA 干擾機制模型。從結果發現抑制 target mRNA 的速度由原來約 100 小時，加快至 30 多小時即可將 target mRNA 降解，不但有較佳的結果，且更具實證性。在未來，我們將加入其他相關 RNA 干擾機制的生物路徑，使其更能完整呈現 RNA 干擾機制在生物體內的真實情況。並計畫針對 Hepatitis B virus 做 RNAi 預測模擬，期望將來能應用在臨床疾病的治療上。

六、參考文獻

- [1] J. Le Bail, H. Alla, R. David, "Hybrid Petri Net," Proc. of the 1st European Control Conference, ECC'91 (Grenoble, France)(1991), pp. 1472-7, July.
- [2] C. T. Bergstrom, E. McKittrick, and R. Antia, "Mathematical models of RNA silencing: Unidirectional amplification limits accidental self-directed reactions.," PNAS(2003), 11511-11516
- [3] A. Doi, M. Nagasaki, S. Fujita, H. Matsuno, S. Miyano, "Genomic Object Net: II. Modeling biopathways by hybrid functional Petri net with extension." Applied Bioinformatics. (2003); 2:

185-8.

- [4] S. M. Hammond, E. Bernstein, D., Beach and G. j. Hannon, "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells.," Nature (2000), 404: 293-296.
- [5] T. Hoken, "Mechanisms of RNAi: mRNA cleavage fragments may indicate stalled RISC.," Journal of RNAi and Gene Silencing. (2005)1, 21-5.
- [6] C. Lipardi, Q. Wei, and B. M. Paterson, "RNAi as random degradative PCR : siRNA primers convert mRNA into dsRNA that are degraded to generate new siRNAs.," Cell (2001), 107: 297-307.
- [7] E. V. Makeyev, D. H. Bamford, "Cellular RNA-dependent RNA polymerase involved in posttranscriptional gene silencing has two distinct activity modes.," Mol Cell. (2002) 10, 1417-1427.
- [8] M. Nagasaki, A. Doi, H. Matsuno, and S. Miyano, "Genomic Object Net: a platform for modeling and simulating biopathways.," Applied Bioinformatics (2003) 2, 181-184.
- [9] V.N. Reddy, Mavrovouniotis, and M.N. Liebman, "Petri net representations in metabolic pathways.," Proc. First ISMB(1993), 328-336.
- [10] R. M. Raab, G. Stephanopoulos, "Dynamics of Gene Silencing by RNA Interference.," Biotechnology and Bioengineering. 88(2004), 121-132.
- [11] R. Valette, "Analysis of Petri Nets by Stepwise Refinement," in *Journal of Computer and System Sciences*(1979), vol. 18, pp. 35-46, Feb.
- [12] P. D. Zamore, T. Tuschl, P. A. Sharp and D. P. Bartel, "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals.," Cell (2000), 101, 25-33.
- [13] <http://www.ambion.com/techlib/tn/131/2.html> 2007
- [14] <http://www.cellillustrator.org/>