Politechnika Śląska
Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki

mgr inż. Magdalena Ochab

Zastosowanie metodyki układów z przełączeniami do opisu i analizy układów biologicznych

Rozprawa doktorska
napisana pod kierunkiem
dra hab. inż. Krzysztofa Puszyńskiego
prof. nzw. w Politechnice Śląskiej

GLIWICE 2019

Prace przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej były częściowo finansowane z grantów ufundowanych przez Narodowe Centrum Nauki **DEC-2014/13/B/ST7/00755** oraz **UMO-2016/23/B/ST6/03455**.

Spis treści

Abstract (ang.) **7**

1 Wprowadzenie **9**
1.1 Motywacja prowadzonych badań . . . 9
1.2 Cele i tezy pracy . . . 11
1.3 Przewodnik po rozdziałach . . . 12

2 Układy z przełączeniami **15**
2.1 Wprowadzenie terminologii i opis matematyczny . . . 16
2.2 Klasyfikacja układów z przełączeniami . . . 17
2.2.1 Układy z przełączeniami zależnymi od czasu . . . 18
2.2.2 Układy z przełączeniami zależnymi od stanu układu . . . 19
2.3 Charakterystyka układów kawałkami liniowych . . . 20
2.4 Układy z przełączeniami a układy biologiczne . . . 21
2.4.1 Zróżnicowanie środowiska wewnątrzkomórkowego . . . 22
2.4.2 Proces produkcji białka . . . 22
2.4.3 Regulacja procesów wewnątrzkomórkowych . . . 23
2.4.4 Sprzężenia zwrotne . . . 25
2.4.5 Stochastyczność procesów biologicznych . . . 27
2.4.6 Wartości parametrów reakcji . . . 27
2.4.7 Przełączenia w układach biologicznych . . . 28
2.5 Przegląd metod . . . 32

3 Wybrana metodologia analizy układów z przełączeniami **37**
3.1 Analityczne rozwiązanie modelu z przełączeniami . . . 38
3.2 Zastosowanie grafu tranzycji do analizy układów z przełączeniami . . . 40
3.3 Analiza punktów stacjonarnych . . . 41
3.3.1 Zwyczajne punkty stacjonarne . . . 42
3.3.2 Rodzaje ścian . . . 42
3.3.3 Osobliwe punkty stacjonarne . . . 46
3.3.4 Analiza bifurkacyjna . . . 56
3.4 Heterogeniczność populacji komórkowej . . . 57
3.4.1 Modelowanie populacji heterogenicznej przy wykorzystaniu układów z przełączeniami . . . 57
3.4.2 Rozkład normalny i centralne twierdzenie graniczne . . . 58
3.4.3 Algorytm symulacji heterogenicznej populacji komórkowej . . . 58
3.5 Modele kawałkami liniowe z losowym przełączeniem . . . 60

3.5.1 Modele kawałkami deterministyczne . . . 60
3.5.2 Modele kawałkami deterministyczne z przełączeniami zależnymi od stanu układu . . . 61
3.5.3 Algorytm symulacji układów z losowymi przełączeniami . . . 62
3.6 Schemat analizy układów PLDE . . . 63

4 Opis i analiza prostych modeli produkcji białka 67
4.1 Model produkcji białka . . . 67
4.2 Wykorzystanie rozwiązań analitycznych modeli . . . 71
4.2.1 Rozwiązanie analityczne równania opisującego poziom mRNA . . . 71
4.2.2 Rozwiązanie analityczne równania opisującego poziom białka . . . 72
4.2.3 Wyliczenie czasu przełączenia . . . 74
4.2.4 Rozwiązanie analityczne równania opisującego poziom białka dla wybranych parametrów . . . 75
4.2.5 Wyliczenie punktów docelowych . . . 76
4.3 Zastosowanie grafu tranzycji do analizy układu produkcji białka . . . 77
4.4 Analiza punktów stacjonarnych w modelach produkcji białka . . . 77
4.4.1 Zwyczajne punkty stacjonarne . . . 78
4.4.2 Osobliwe punkty stacjonarne . . . 80
4.4.3 Analiza bifurkacyjna . . . 82
4.5 Heterogeniczność populacji komórkowej wynikająca ze zróżnicowania progu aktywacji genów . . . 84
4.5.1 Losowe położenie progu aktywacji genu . . . 85
4.5.2 Zróżnicowanie czasu podania leku . . . 88
4.5.3 Zróżnicowanie progu aktywacji genu oraz czasu podania leku . . . 89
4.6 Modele produkcji białka z losowym przełączeniem . . . 90
4.7 Dyskusja . . . 98

5 Model modułu regulatorowego białka p53 103
5.1 Opis modelu modułu regulatorowego białka p53 . . . 104
5.2 Rozwiązanie analityczne modelu szlaku regulatorowego białka p53 . . . 110
5.2.1 Wyznaczenie rozwiązań analitycznych w poszczególnych domenach . 110
5.2.2 Określenie wartości punktów docelowych . . . 113
5.2.3 Wyznaczenie czasu przełączenia . . . 113
5.3 Graf tranzycji modelu modułu białka p53 dla różnych wymuszeń . . . 114
5.4 Analiza punktów stacjonarnych modelu szlaku regulatorowego białka p53 . . . 117
5.4.1 Zwyczajne punkty stacjonarne . . . 117
5.4.2 Osobliwe punkty stacjonarne . . . 118
5.4.3 Analiza bifurkacyjna . . . 125
5.5 Heterogeniczność populacji komórkowej . . . 128
5.5.1 Wpływ położenia progu $\theta_{\mathbf{P}}$ na odpowiedź komórki . . . 130
5.5.2 Wpływ położenia progu θ_T na odpowiedź komórki . . . 137
5.5.3 Wpływ położenia progów θ_{N1} i θ_{N2} na odpowiedź komórki . . . 139
5.5.4 Zróżnicowanie aktywacji wszystkich procesów w modelu . . . 142
5.6 Model szlaku regulatorowego białka p53 z losowym przełączeniem . . . 144
5.6.1 Wyniki otrzymane przy zastosowaniu układu bez wymuszenia . . . 147

5.6.2 Wyniki otrzymane przy zastosowaniu układu ze średnimi wartościami wymuszenia . . . 147
5.6.3 Wyniki otrzymane przy zastosowaniu układu z wysokimi wartościami wymuszenia . . . 149
5.6.4 Porównanie wyników . . . 151
5.7 Dyskusja . . . 153

6 Podsumowanie **159**

Bibliografia **161**

Spis rysunków **168**

Spis tabel **171**

Spis osiągnięć autorki **173**

Abstract

Mathematical modeling of biological processes works as support in research on the intercellular regulatory networks in proper and pathogenic changed cells and their response to different external stimuli. Basic approach to modeling highly complicated protein networks is using nonlinear models, which are capable to imitate very complex dynamics, but their analysis is very difficult and limited. In my doctoral thesis I propose application of the piece-wise linear differential equation (PLDE) models to biological, intercellular systems. Such systems are consisted on set of linear subsystems and switching signal to determine the order of the subsystems. Dynamics in subsystems, described by simple linear differential equations, determine system behavior in specific state or time. Switchings between subsystems produce rapid changes in system dynamics, such as gene activation, enzymatic reaction activation or drug application. Systems with switchings are well known in system theory and its application, however in biological models there are quite uncommon. I propose a complex method for analysis biological PLDE models based on well-known analytical methods (such as finding analytical solution or creating transition graphs), bibliographic methods adjusted to specific type of models (for calculating regular and singular stationary point) and my own algorithms for investigating behavior of heterogenous population. Localization of stationary point and bifurcation analysis presents possible behavior of the system for different range of parameters. Heterogeneity of the population was investigated by two original alghoritms. In first, simulations of the population with random localization of the threshold visualize influence of differences between cells in final protein levels and cell fate. In second, stochastic simulations of the piece-wise deterministic protein models show how important for the protein dynamics is random activation and deactivation of processes. Proposed algorithm was used for analysis of the two biological systems. The first created model was simple protein production model with two different types of autoregulation: positive and negative. The second created model was model of the p53 regulatory module, which is responsible for proper response of the cell to the DNA damages. In each case firstly I created linear models with switchings, then I found the solution for the linear models in each sub-domain, created the transition graphs and calculated the stationary points. Then I made the analysis of the heterogenous cell population beahaviour by randomization of the switching thresholds localization. Finally I investigated the influence of the stochasticity in the switching process on the response of the cells population to the external stimuli. The algorithm proposed for analysis of the biological PLDE models helps with better understanding of the modeled systems. Based on the results I can prove, that change in threshold values have impact on the assumed target reachability in according to existed type of feedback loop. Moreover, stochasticity in the switching between subsystems allow us modeling the heterogeneity of the cell population observed in biological experiments. Additionally, with increase of the randomness of the switching between subsystems increases desynchronization of the oscillation and noisiness of the time courses. Moreover, there is the relationship between randomness and diversification in the cell response but it is on the strength of the external stimuli.

Rozdział 1

Wprowadzenie

1.1 Motywacja prowadzonych badań

Procesy biologiczne są skomplikowane, wieloetapowe i regulowane przez szereg różnych czynników zarówno chemicznych, fizycznych, jak i biologicznych. Wszystkie substancje występujące wewnątrz komórki, zarówno związki organiczne, jak i nieorganiczne, są powiązane ze sobą siecią wzajemnych oddziaływań. Głównym celem badań, prowadzonych nad funkcjonowaniem komórki, jest lepsze poznanie procesów zachodzących w prawidłowych komórkach oraz w komórkach chorobowo zmienionych, a także wpływu oddziaływań zewnętrznych (np. w postaci związków chemicznych, temperatury czy różnych typów promieniowania) na funkcjonowanie komórki, jak i całego organizmu. Badania takie prowadzą do lepszego poznania procesów, zarówno prawidłowych jak i patologicznych, oraz możliwości oddziaływania na nie. Dalekosiężnym celem badań jest zaproponowanie terapii skutecznej, szybkiej i wywołującej niewiele skutków ubocznych dla pacjenta.

Wsparciem dla badań eksperymentalnych, zarówno prowadzonych na komórkach *in vitro*, jak i już w organizmach żywych *in vivo*, jest modelowanie matematyczne, które umożliwia analizę teoretyczną właściwości badanych procesów. Modelowanie matematyczne w kontekście badań procesów biologicznych ma bardzo szerokie zastosowanie, m.in.: sprawdzenie hipotetycznej struktury układu, proponowanie możliwych oddziaływań między związkami, badanie dynamiki odpowiedzi układu na dane wymuszenie, określenie wpływu modyfikacji układu na uzyskiwaną odpowiedź, a także postulowanie optymalnego harmonogramowania przy wielokrotnych wymuszeniach (np. dawkach leku lub promieniowania). Wybór sposobu modelowania, struktury i stopnia skomplikowania modelu jest uzależniony od charakteru modelowanego układu, dostępnej wiedzy (dane literaturowe oraz wyniki eksperymentalne) oraz celu, jaki przyświecał podjęciu badań *in silico*. Podstawowym problemem podczas modelowania matematycznego jest znalezienie optimum pomiędzy stopniem skomplikowania modelu a jego zdolnością do posiadania dynamiki, zgodniej z dynamiką rzeczywistego systemem. Wraz ze wzrostem złożoności modelu na ogół wzrasta jego zdolność do odwzorowania skomplikowanych oddziaływań między białkami i innymi związkami. Jednakże jednocześnie pojawia się trudność w zaproponowaniu właściwej struktury układu oraz dobrania uzasadnionych biologicznie wartości parametrów. Równocześnie, nieznajomość dokładnych mechanizmów procesów oraz brak wyników eksperymentalnych niejednokrotnie uniemożliwia potwierdzenie poprawności postulowanych założeń i wyników uzyskanych na podstawie modelu.

Wraz ze wzrostem mocy obliczeniowej komputerów, wśród naukowców pojawił się trend

wykorzystywania coraz bardziej złożonych, silnie nieliniowych modeli matematycznych. Zaproponowane zostały algorytmy, które pozwalają na szybkie otrzymanie przebiegów czasowych, nawet bardzo skomplikowanych modeli, przy zastosowaniu metod numerycznych, deterministycznych (np. algorytm Rungego-Kutty) czy stochastycznych (tj. algorytm Gillespiego). Podstawową wadą takiego podejścia jest brak możliwości analitycznego badania stworzonych modeli.

W niniejszej pracy przedstawiłam możliwości zastosowania układów z przełączeniami do modelowania i analizy procesów biologicznych. Układy z przełączeniami są dobrze znaną w automatyce klasą układów, w których występuje skokowa zmiana struktury lub parametrów układu. Podstawowe założenie przy stosowaniu tego typu układów do modelowania procesów, polega na podziale systemu na funkcjonalne części różniące się dynamiką. Każdy podsystem opisuje zachowanie się układu w danych warunkach lub w danym czasie, co pozwala na zachowanie jego względnej prostoty. Skokowe zmiany pomiędzy podsystemami pozwalają na modelowanie nagłych zmian w systemie, takich jak aktywacja ekspresji genu po nagromadzeniu się czynników transkrypcyjnych, aktywacja sprzężenia ujemnego (lub dodatniego) po akumulacji enzymów, zmiana dynamiki procesów po podaniu leku lub zadziałaniu czynnikiem stresowym. Szczególnym przypadkiem układów z przełączeniami są układy kawałkami liniowe. Układy takie ze względu na swoją kompartmentalną strukturę, mogą być analizowane nie tylko na drodze numerycznych symulacji, ale również metodami analitycznymi. W niniejszej rozprawie skupiłam się na analizie układów biologicznych, a dokładnie wewnątrzkomórkowych. W celu scharakteryzowania zachowania układu w poszczególnych domenach można wyznaczyć rozwiązanie analityczne oraz punkty docelowe trajektorii. Stworzenie grafu tranzycji pozwala na jakościowe zobrazowanie zachowania pełnego układu, natomiast wyznaczenie punktów stacjonarnych pozwala wnioskować o występowaniu punktów lokalnie stabilnych lub oscylacji w układzie. W celu pełnego zbadania charakteru układu zaproponowałam, aby powyższe, znane z literatury metody rozszerzyć o analizę heterogeniczności populacji. Pierwsza z proponowanych metod polega na wprowadzeniu do modeli losowej lokalizacji wartości progowych, która oddaje aktywację procesów przy różnych stężeniach substancji regulatorowych w poszczególnych komórkach. Druga metoda pozwala na uwzględnienie losowości aktywacji i dezaktywacji procesów enzymatycznych, poprzez wykonanie symulacji modelu ze stochastycznymi przełączeniami między podsystemami. Modele ze stochastycznym przełączeniem mogą posłużyć do zbadania odpowiedzi populacji o różnych zakresach wrażliwości na stężenia czynnika regulatorowego. Głównym osiągnięciem niniejszej pracy jest zastosowanie układów z przełączeniami do opisu systemów biologicznych oraz zaproponowanie metodyki kompleksowej analizy tych układów przy wykorzystaniu znanych metod analizy układów liniowych, literaturowych metod analizy układów kawałkami liniowych, a także autorskich algorytmów symulacji i analizy populacji heterogenicznej oraz układów kawałkami deterministycznych. Zaproponowana analiza układów z przełączeniami pozwala na lepsze poznanie ich właściwości, a przez to lepsze poznanie analizowanego systemu biologicznego. Niniejsza metodyka została zilustrowana poprzez analizę dwóch różnych systemów biologicznych: prostych układów produkcji białka z autoregulacją (jeden ze sprzężeniem dodatnim, drugi ujemnym) oraz modułu regulatorowego białka p53.

1.2 Cele i tezy pracy

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie metody opisu i analizy złożonych układów biologicznych, przy wykorzystaniu metodyki układów z przełączeniami. Zaproponowane modele przedstawiają mechanizmy regulacyjne zachodzące w komórkach, co pozwalając na lepsze scharakteryzowanie badanych układów, a także zbadanie zakresów wymuszeń umożliwiających uzyskanie pożądanych odpowiedzi. Badania, wykonane w ramach prac nad rozprawą, można podzielić na kilka zadań:

- **Identyfikacja procesów wewnątrzkomórkowych, które mogą być modelowane za pomocą skokowej zmiany układu;**
  Wśród różnorodnych procesów wewnątrzkomórkowych można wyróżnić takie, których przebieg jest warunkowany obecnością cząsteczek regulatorowych. Aktywacja lub dezaktywacja tych procesów może być modelowana przy pomocy funkcji skokowych, co prowadzi do powstania układów z przełączeniami. Dodatkowo, zewnętrzna ingerencja, np. podanie leku czy zadziałanie stresem, może być modelowana jako skokowa zmiana pewnych parametrów lub struktury układu.

- **Budowa modeli układów biologicznych przy wykorzystaniu metodyki układów z przełączeniami;**
  Stworzone modele reprezentują dwa systemy biologiczne: pierwszy to model produkcji białka w układzie ze sprzężeniem dodatnim lub ujemnym, natomiast drugi to model modułu regulatorowego białka p53, odpowiedzialnego za aktywację odpowiedzi komórkowej na stres.

- **Analiza stabilności modeli;**
  W ramach badania stabilności stworzonych modeli, zostały wyznaczone i zlokalizowane punkty stacjonarne, znajdujące się zarówno wewnątrz podukładów, jak i na granicy pomiędzy podukładami. Zostały zbadane zakresy parametrów, dla których układ znajduje się na granicy stabilności, co objawia się występowaniem oscylacji. Została również wykonana analiza bifurkacyjna modeli.

- **Analiza wpływu losowej lokalizacji progu aktywacji procesu na różnorodność odpowiedzi wewnątrzpopulacyjnej;**
  Losowa lokalizacja progu aktywacji procesu skutkuje zróżnicowaniem wrażliwości komórki na czynniki regulatorowe. W efekcie powstaje populacja, w której aktywacja procesu występuje przy różnych stężeniach czynników regulatorowych, co skutkuje zróżnicowaniem odpowiedzi komórek poddanych działaniom tych samych sygnałów.

- **Analiza wpływu losowej aktywacji procesu na zróżnicowanie odpowiedzi układu;**
  Losowa aktywacja procesów wpływa na zróżnicowanie przebiegów czasowych poziomu białka w populacji. Obserwuje się desynchronizację oscylacji oraz podział na subpopulacje. Poziom wrażliwości układu na wymuszenie oraz szybkość aktywacji odpowiedzi jest również zależna od losowej aktywacji procesu.

Wykonane badania pozwoliły na wykazanie prawdziwości następujących tez:

1. Zmiany wartości progowych, przy których następuje przełączenie zależne od stanu układu, odzwierciedlające różnice między komórkami, wpływają na osiągnięcie założonych celów terapeutycznych w sposób zależny od sprzężeń występujących w tym układzie.

2. Uwzględnienie stochastyczności w przełączaniu między podsystemami pozwala oddać obserwowalną biologicznie heterogeniczność populacji komórkowej.

3. Większy poziom losowości w przełączaniu pomiędzy podukładami, odzwierciedlający zwiększoną wrażliwość komórek na czynniki regulatorowe, skutkuje desynchornizacją odpowiedzi komórek na wymuszenie w czasie, dużym zaszumieniem przebiegów czasowych oraz wpływa na zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej.

1.3 Przewodnik po rozdziałach

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z sześciu rozdziałów oraz bibliografii i innych uzupełniających załączników.

Pierwszy rozdział stanowi wstęp, w którym przedstawiłam motywację prowadzonych badań, nakreśliłam problem badawczy, zaprezentowałam zakres wykonanych prac oraz sformułowałam tezy pracy.

Drugi rozdział zawiera opis matematyczny układów z przełączeniami oraz wprowadzenie terminologii. Przedstawiłam w nim klasyfikację układów z przełączeniami oraz ich charakterystykę ze szczególnym uwzględnieniem układów mających zastosowanie do systemów biologicznych. Rozdział ten zawiera również przegląd literatury dotyczącej zastosowania różnych typów układów z przełączeniami do modelowania systemów biologicznych.

Trzeci rozdział przedstawia metodologię stosowaną do analizy układów kawałkami liniowych. W rozdziale tym przedstawiłam znane z literatury metody analizy układów z przełączeniami, a ich zastosowanie zaprezentowałam na przykładowych układach. Rozdział ten zawiera również autorskie metody modelowania populacji komórkowej przy wykorzystaniu układów z przełączeniami. Pierwsza z metod pozwala na zamodelowania heterogenicznej populacji komórkowej poprzez zróżnicowanie wartości progowych w układzie. Natomiast druga metoda przedstawia sposób modelowania losowych przełączeń w celu zbadania wpływu losowości aktywacji i dezaktywacji procesów na odpowiedź populacji komórkowej.

Czwarty rozdział zawiera opis oraz analizę modeli produkcji białka, przy wykorzystaniu metodologii znanej z literatury oraz zaproponowanej przez autorkę. Stworzyłam dwa modele produkcji białka z różnymi rodzajami autoregulacji: jeden ze sprzężeniem ujemnym i jeden ze sprzężeniem dodatnim. Modele rozbudowałam o proces wymuszonej degradacji białka poprzez wprowadzenie leku do układu. Celem podania leku było obniżenie poziomu białka poniżej zadanego celu terapeutycznego. Wykonana analiza stabilności, określenie typów oraz lokalizacji punktów stacjonarnych pozwoliła na scharakteryzowanie układów i poznanie charakteru odpowiedzi na dany czynnik zewnętrzny. Eksperymenty na populacji, zróżnicowanej pod względem lokalizacji wartości progowych, wykazały występowanie bistabilności w układzie ze sprzężeniem dodatnim oraz oscylacji w układzie ze sprzężeniem ujemnym. Natomiast, wyniki modelowania uwzględniającego stochastyczną aktywa-

cję genów, potwierdzają zależność osiągalności celu terapeutycznego od rodzaju sprzężeń, występujących w układzie oraz stopnia wrażliwości komórki na czynniki transkrypcyjne.

W piątym rozdziale przedstawiłam model modułu regulatorowego białka p53 oraz jego analizę. Stworzony przeze mnie model stanowi uproszczone przedstawienie zależności występujących pomiędzy białkami p53, MDM2 oraz PTEN, które umożliwiają utrzymanie prawidłowego poziomu białka p53 oraz szybką reakcję na uszkodzenia DNA, adekwatną do ich stopnia. Model, dzięki pętlom sprzężenia ujemnego oraz dodatniego, umożliwia oddanie skomplikowanej dynamiki obserwowanej w rzeczywistych układach. W tym rozdziale wykonałam analiza stabilności stworzonego modelu, wyznaczyłam punkty stacjonarne odpowiadające stabilizacji poziomu białka p53 na niskim poziomie (stan normalny) lub na wysokim poziomie (apoptoza), a także oscylacjom poziomów białek (obserwowane w fazie naprawy DNA i blokady cyklu komórkowego). Symulacje populacji heterogenicznej, pod względem lokalizacji poszczególnych progów aktywacji procesów, pozwoliły na zbadanie typu odpowiedzi komórkowej przy wystąpieniu anomalii: zbyt niskiej lub zbyt wysokiej aktywności danego czynnika regulatorowego. Badając wpływ losowości aktywacji i dezaktywacji procesów, wykazałam zdolność do aktywacji apoptozy komórek o dużej wrażliwości na czynniki regulatorowe, przy niższych dawkach stresu. Jednocześnie, odpowiedź komórek bardziej wrażliwych na niskie stężenia cząsteczek regulatorowych jest bardziej zdesynchronizowana, a czas potrzebny na podjęcie decyzji apoptotycznej wydłuża się.

W ostatnim rozdziale zawarłam podsumowanie otrzymanych wyników oraz prezentację wniosków, wyciągniętych na podstawie przeprowadzonych badań.

Po części głównej rozprawy zamieściłam spis wykorzystanej bibliografii, spis rysunków i tabel. Przedstawiony dokument zakończony jest spisem moich osiągnięć i publikacji.

Rozdział 2

Układy z przełączeniami

Wśród szerokiej klasy układów hybrydowych, można wyróżnić układy z przełączeniami, czyli takie, które składają się z dwóch lub więcej podukładów oraz reguł określających przełączenia pomiędzy nimi. Skutkiem takiej budowy jest zdolność do wykazywania kilku różnych rodzajów dynamiki jednocześnie. Przykładowo, układy takie mogą posiadać ciągłą i dyskretną dynamikę, w zależności od trybu pracy lub podsystemu układu [1, 2]. Układy z przełączeniami są dobrze znane w literaturze i mają wiele zastosowań praktycznych. Jako przykład można wymienić przetworniki mocy [3], układy napędowe dysków komputerowych [4], silniki krokowe [5], systemy robotyczne [6], autonomiczne pojazdy [7], systemy z danymi próbkowanymi [8] lub ze zdarzeniami dyskretnymi [9], a także sieci telekomunikacyjne [10].

Metody znane z teorii sterowania i stosowane w różnych dziedzinach automatyki, wzbudzają coraz większe zainteresowanie wśród osób zajmujących się nowymi, rozwijającymi się dziedzinami nauki, takimi jak biologia systemów, biotechnologia czy inżynieria biomedyczna. Stopień skomplikowania rzeczywistych systemów biologicznych jest bardzo duży, a poszczególne elementy są połączone złożoną siecią wzajemnych oddziaływań. Poznanie struktury i właściwości układów biologicznych nie jest zadaniem trywialnym ze względu na ograniczone możliwości badań laboratoryjnych, co ma szczególne znacznie w przypadku procesów wewnątrz- oraz międzykomórkowych. Ponadto komórki mają skomplikowaną strukturę wewnętrzną, zawierają różnorodne związki chemiczne, zarówno organiczne, jak i nieorganiczne. Pomimo szybkiego rozwoju metod eksperymentalnych stosowanych w badaniach komórkowych, działanie komórek, zarówno prawidłowych, jak i zmienionych chorobotwórczo, ciągle jeszcze nie jest w pełni zbadane. Szczególnie interesujące są procesy o znaczeniu terapeutycznym, których dokładne poznanie pozwoli na zaproponowanie sposobu oddziaływania na komórkę czy cały organizm. Z pomocą w poznaniu właściwości układów biologicznych przychodzi modelowanie matematyczne oraz analiza systemowa, stanowiąc wsparcie, zarówno przy projektowaniu badań laboratoryjnych, jak i przy potwierdzaniu lub wykluczaniu stawianych hipotez.

Układy z przełączeniami są metodą stanowiącą pomost pomiędzy prostymi systemami liniowymi a bardziej złożonymi – nieliniowymi. Układy liniowe są łatwiejsze w analizie, ze względu na swoją nieskomplikowaną strukturę. Znanych jest wiele metod pozwalających na badanie ich stabilności czy sterowalności. Z drugiej jednak strony, układy liniowe mają ograniczone możliwości odwzorowania skomplikowanej dynamiki złożonych systemów biologicznych. Z kolei układy nieliniowe, ze względu na nieograniczoną pulę nieliniowych funkcji, które można wykorzystać, dają ogromne możliwości modelowania dowolnej wręcz dynamiki. Do popularnie wykorzystywanych funkcji można zaliczyć przede wszystkim funk-

cje potęgowe, eksponencjalne czy logarytmiczne. Znaczącą wadą modeli nieliniowych są ograniczone możliwości analizy. Znalezienie rozwiązania analitycznego jest na ogół niemożliwe, a analiza stabilności może być przeprowadzona tylko lokalnie. W układach kawałkami liniowych z przełączeniami wykorzystuje się zalety dwóch powyższych metod. Z jednej strony, przełączenia pomiędzy podukładami mogą tworzyć skomplikowaną dynamikę, umożliwiającą powstanie oscylacji, cykli granicznych, bistabilności czy chaosu. Z drugiej strony, podukłady są opisywane przez stosunkowo proste w analizie modele liniowe, co umożliwia wykorzystania wielu narzędzi do liniowej analizy.

Należy mieć na uwadze, że przełącznik występujący fizycznie w układzie i przełączenie w modelu matematycznym nie muszą sobie odpowiadać. Z jednej strony, istnieją układy rzeczywiste z fizycznymi przełączeniami, takimi jak zmiana stanu genu z nieaktywnego na aktywny, które mogą być modelowane w różnorodny sposób. Z drugiej jednak strony, mamy narzędzie matematyczne, czyli model matematyczny danego układu, zapisany w sposób jawnie posiadający różne podsystemy i przełączenia między nimi. Co ważne, model matematyczny może opisywać układ fizyczny, w którym faktycznie występują przełączenia, ale nie jest to warunek konieczny. Poprzez przełączenia można modelować nie tylko skokowe zmiany stanu układu, ale również procesy, które nie są fizycznie przełącznikiem. Przykładem takich procesów może być enzymatyczna regulacja procesów biochemicznych, podczas której występuje silnie nieliniowy, sigmoidalny wzrost tempa reakcji w zależności od stężenia substratu. W takim przypadku, skokowe przełączenie między stanami jest pewnym przybliżeniem ciągłego procesu.

2.1 Wprowadzenie terminologii i opis matematyczny

Układ z przełączeniami to układ dynamiczny, który składa się ze skończonej liczby podukładów oraz reguł logicznych, określających przełączenia pomiędzy podukładami. Podukłady mogą być również określane pojęciami podsystemy, tryby oraz domeny. Zachowanie układu w poszczególnych domenach jest opisywane poprzez zbiór równań różniczkowych lub różnicowych. Ogólna definicja układu z przełączeniami nie wprowadza wymogu liniowości modeli w podukładach, zatem podukład może być opisany dowolnymi funkcjami f. Podstawowy opis układu ciągłego z przełączeniami może mieć następującą strukturę:

$$\frac{dx(t)}{dt} = f_i(x(t), u(t)), \quad t \in \mathbb{R}^+, \quad i \in \mathcal{I} = \{1, ..., N\}, \tag{2.1}$$

gdzie $x \in \mathbb{R}^n$ to stan układu, $u \in \mathbb{R}^m$ to sterowanie, $\mathbb{R}^+$ oznacza nieujemne liczby rzeczywiste, natomiast skończony zbiór $\mathcal{I}$ to zbiór indeksów i oznacza kolekcję dyskretnych podukładów. Podobnie można przedstawić układy z przełączeniami o dyskretnym czasie, jako zbiór równań różnicowych:

$$x(k+1) = f_i(x(k), u(k)), \quad k \in \mathbb{Z}^+, \quad i \in \mathcal{I} = \{1, ..., N\}, \tag{2.2}$$

gdzie $\mathbb{Z}^+$ fo nieujemne liczby całkowite.

Reguła logiczna, która określa przełączenia między podukładami, generuje sygnał przełączający, który przeważnie jest opisywany jako klasa kawałkami stałej mapy, $\sigma : \mathbb{R}^+ \to \mathcal{I}$ lub sekwencji $\sigma : \mathbb{Z}^+ \to \mathcal{I}$. Index $i = \sigma(t)$ jest nazywany aktywnym trybem (podukładem) w chwili czasu t. Sekwencja aktywnych trybów może być zależna nie tylko od czasu t, ale również od aktualnego stanu układu x, i/lub przeszłych aktywnych stanów $\sigma(\tau)$ dla $\tau < t$.

W układach ciągłych z przełączeniami zależnymi od stanu może wystąpić zjawisko ślizgania się trajektorii po powierzchni granicy między podsystemami (ang. *sliding modes*) [11, 12].Zjawisko ślizgania się po powierzchni może być stosunkowo łatwo zidentyfikowane i może być jednym z elementów opisu dynamiki danego układu. Jednakże w niektórych badaniach, np. przy rozważaniu problemu stabilności układu, wprowadza się założenie, które pozwala na wykluczenie takiego zachowania. Zakłada się, że sygnał $\sigma(t)$ ma skończoną liczbę nieciągłości w skończonym przedziale $\mathbb{R}^+$. W efekcie czego, w układzie nie występuje poślizg na granicy (ang. *no-chattering behaviour*). W układach z czasem dyskretnym nie ma możliwości wystąpienia takiego zjawiska.

Podsumowując, w układach z przełączeniami występują podsystemy, które opisują niskopoziomową, lokalną dynamikę, poprzez zwyczajne równania różniczkowe lub różnicowe. Ponadto taki układ zawiera wysokopoziomowego koordynatora (nadzorcę, ang. *supervisor*), który produkuje przełączenia pomiędzy lokalną dynamiką [2]. Dynamika pełnego układu jest determinowana zarówno przez strukturę podukładów, jak i sygnał przełączający [13].

2.2 Klasyfikacja układów z przełączeniami

Układy z przełączeniami ze względu na typ przełączenia dzieli się na:

- **zależne od czasu**, jeśli warunek przełączenia między podukładami jest uzależniony od czasu;
- **zależne od stanu układu**, jeśli warunek przełączenia między podukładami zależy od stanu układu;
- **zależne od historii**, jeśli warunek przełączenia między podukładami zależy od przeszłych wartości sygnału przełączającego lub przeszłego aktywnego trybu;
- **zależne od wyjścia**, jeśli warunek przełączenia pomiędzy podukładami zależy od wyjścia z systemu;
- **zależne od zewnętrznych sygnałów**, jeśli warunek przełączenia pomiędzy podukładami jest uzależniony od zewnętrznych sygnałów.

Oczywiście w układzie mogą występować różne przełączenia jednocześnie, zatem dany układ może należeć jednocześnie do kilku klas. Ponadto układy można również dzielić ze względu na możliwość sterowania nimi. W takim przypadku wyróżnia się układy:

- **autonomiczne**, gdy nie ma możliwości bezpośredniego sterowania mechanizmem przełączającym pomiędzy podukładami;
- **sterowane**, jeśli przełączenia między podukładami są narzucone przez projektanta danego systemu tak, aby osiągnąć pożądane zachowanie [13].

Układy z przełączeniami można również klasyfikować ze względu na sposób przekazywania sygnałów w podukładach je tworzących:

- **Układy ciągłe**, czyli takie, których podukłady posiadają wszystkie elementy działające w sposób ciągły i mogą przyjmować każdą wartość z przedziału zmienności sygnału. Wartość wyjściowa również może przyjmować dowolną wartość z ciągłego przedziału. Podukłady tego typu opisuje się równaniami różniczkowymi.

- **Układy dyskretne**, czyli zbudowane z podukładów, w których co najmniej jeden element pracuje w sposób dyskretny, a sygnały wysyłane przez niego mogą przyjmować tylko określone wartości i występować w określonych chwilach czasu. Do opisu takich podukładów stosuje się równania różnicowe.
- **Układy mieszane**, czyli układy zawierające podukłady zarówno ciągłe, jak i dyskretne.

Ze względu na rodzaje elementów, z jakich zbudowane są podukłady, układy dzieli się je na:

- **Układy kawałkami liniowe**, gdy modele matematyczne podukładów są zbudowane wyłącznie z elementów linowych. Podukłady takie opisane są liniowymi równaniami o stałych współczynnikach.
- **Układy kawałkami nieliniowe**, jeśli model matematyczny danego podukładu zawiera co najmniej jeden element nieliniowy. Opisuje się je równaniami nieliniowymi różnego typu.

Ze względu na charakter przełączenia, układy mogą być podzielone na:

- **deterministyczne**, w których przełączenie jest warunkowane regułami deterministycznymi, tj. przez stałe, ściśle określone wartości progów,
- **losowe**, w których przełączenie zależne jest od funkcji gęstości prawdopodobieństwa powiązanych z wartościami progowymi.

W kolejnych podrozdziałach zostały szczegółowo omówione dwa główne rodzaje układów, klasyfikowane ze względu na typ przełączenia – układy z przełączeniami zależnymi od stanu oraz czasu.

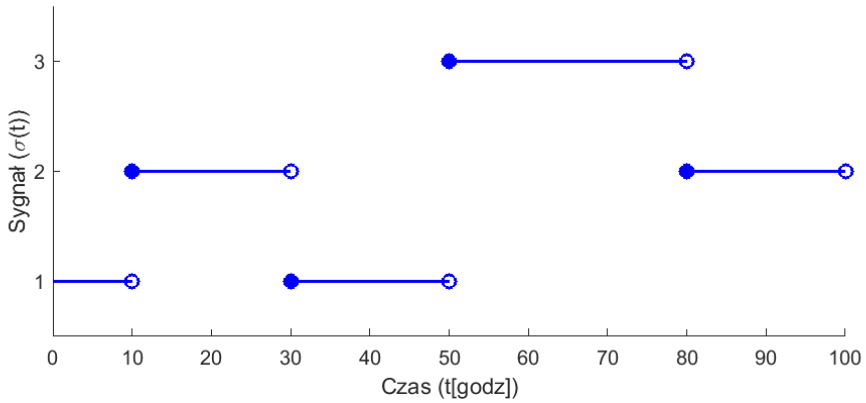
2.2.1 Układy z przełączeniami zależnymi od czasu

W układach z przełączeniami zależnymi od czasu występuje sygnał przełączający, który jest kawałkami stałą, prawostronnie ciągłą funkcją $\sigma : [0, \infty) \to \mathcal{N}$. Funkcja przełączająca σ ma skończoną liczbę nieciągłości i przyjmuje stałe wartości w interwałach pomiędzy przełączeniami. Rolą sygnału przełączającego jest określenie aktywnego podukładu opisującego system w danym czasie. Ogólne równanie opisujące układy z przełączeniami zależnymi od czasu jest następujące:

$$\dot{x}(t) = f_{\sigma(t)}(x(t)), \tag{2.3}$$

gdzie x to zmienna stanu, f to funkcja opisująca model w danym podukładzie, zależna od stanu układu. Ponadto funkcja opisująca układ jest bezpośrednio zależna od sygnału przełączającego σ. W układach takich przyjmuje się, że nie ma wymuszeń albo są one stałe w danej domenie i traktuje się je jako parametr. Przykładowy sygnał przełączający w układzie z trzema podukładami został przedstawiony na Rysunku 2.1.

Układy z przełączeniami zależnymi od czasu są wykorzystywane w modelowaniu procesów biologicznych, których właściwości zmieniają się niezależnie od stanu układu. Przykładem mogą być układy z cyklicznymi zmianami, takie jak cykl dobowy czy komórkowy, w których przejście do kolejnych faz cyklu może być modelowane poprzez przełączenie zależnie od czasu. Innym zastosowaniem jest modelowanie kuracji farmakologicznej, gdzie podanie leku – jedno- lub wielokrotne – może powodować skokową zmianę struktury układu [14].

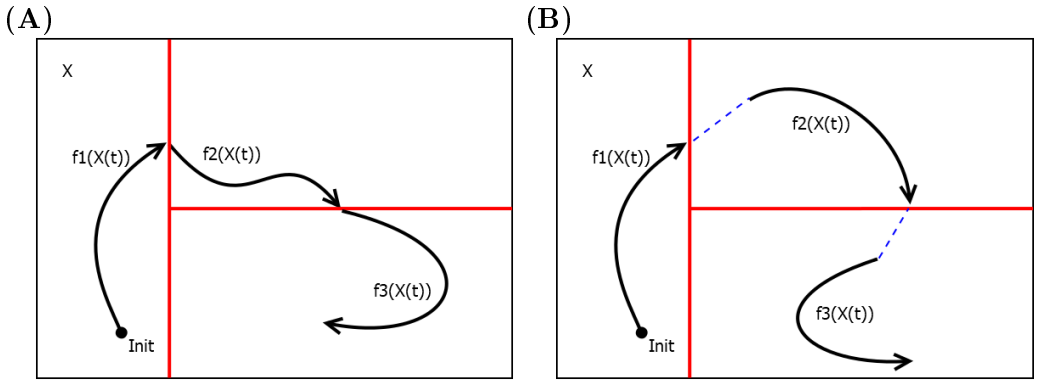


Rysunek 2.1: Sygnał przełączający (σ) w układzie z przełączeniami zależnymi od czasu

2.2.2 Układy z przełączeniami zależnymi od stanu układu

W układach z przełączeniami zależnymi od stanu układu, przełączenia między domenami następują w momencie osiągnięcia przez odpowiednie zmienne określonych wartości progowych. Przestrzeń stanu takiego układu jest podzielona na podukłady poprzez zbiór powierzchni przełączających. Powierzchnie przełączające określają granice między podukładami, nazywanymi często regionami lub domenami, ponieważ są ściśle związane z lokalizacją w przestrzeni stanu.

Przykładowe systemy, w których przestrzeń stanu jest podzielona przez dwie wartości graniczne na trzy podukłady, są przedstawione na Rysunku 2.2. Gdy trajektoria układu trafia na powierzchnię przełączającą, następuje skokowa zmiana domeny. W chwili przełączenia może występować zmiana wartości parametrów opisujących dany układ, zmiana całej struktury układu, zmiana charakteru podukładu (np. z ciągłego na dyskretny) lub zmiana stanu układu. Jeśli w chwili przełączenia nie występuje skokowa zmiana stanu układu, to trajektorie są ciągłe, a przejście przez granicę powoduje jedynie zmianę funk-



Rysunek 2.2: Przestrzeń stanu w układach z przełączeniami zależnymi od stanu układu; (A) Przełączenie powoduje zmianę modelu; (B) Przełączenie powoduje zmianę modelu oraz stanu układu; (Czerwone linie - wartości graniczne, czarne strzałki - przykładowa trajektoria, *Init* - punkt początkowy, niebieskie linie - zmiana stanu układu)

cji opisujących układ (Rysunek 2.2A). Natomiast jeśli w czasie przejścia przez granicę następuje również skokowa zmiana stanu układu, trajektorie układu są nieciągłe, co jest przedstawione na Rysunku 2.2B.

Przykładem układu biologicznego, w którym występują przełączenia zależne od stanu układu, może być prosta sieć genowo-białkowa. Stan genu przyjmuje wartości: aktywny lub nieaktywny, co może odpowiadać podziałowi układu na dwie domeny. Natomiast granicę między tymi domenami wyznacza poziom białka, będącego czynnikiem transkrypcyjnym, odpowiadającym za aktywację genu. Po przekroczeniu pewnej liczbie cząsteczek białka ($P(t)$) następuje aktywacja genu, co w modelu oznacza przejście do drugiej domeny oraz skokową zmianę stanu układu (zmienna opisująca gen $G(t)$ zmienia wartość z 0 na 1).

Białko, mRNA oraz inne cząsteczki, w przeciwieństwie do genów występują w bardzo dużej liczbie: od setek do dziesiątek tysięcy cząsteczek w jednej komórce, dlatego wygodniej modelować ich liczbę poprzez równania ciągłe, a nie dyskretne przełączenia między stanami. W modelach kawałkami liniowych, opisujących tylko poziomy cząsteczek o dużej liczbie (np. białka), podczas przejścia przez wartość graniczną, na ogół zmianie ulega jedynie struktura i/lub parametry modelu, natomiast nie występuje skokowa zmiana stanu układu [15, 16]. Modelowanie zmian poziomu białka w sposób skokowy byłoby uzasadnione jedynie w przypadku bardzo gwałtownej dynamiki w układzie.

2.3 Charakterystyka układów kawałkami liniowych

Szczególną podgrupą układów z przełączeniami są układy kawałkami liniowe, nazywane w literaturze anglojęzycznej *piece-wise linear differential equation (PLDE) models* [17]. Układy takie składają się ze zbioru podukładów liniowych, które są stosunkowo łatwe w analizie. Przełączenia między podukładami mogą być zależne od stanu układu lub od czasu. Układy kawałkami liniowe można w bardzo intuicyjny sposób wykorzystać do tworzenia modeli matematycznych rzeczywistych systemów biologicznych, a w szczególności modeli sieci genowo-białkowych. Zgodnie z prawem działania mas, któremu podlegają również procesy wewnątrzkomórkowe, szybkość reakcji chemicznej jest proporcjonalna do stężenia wszystkich uczestniczących w niej reagentów [18]. Dzięki temu założeniu, podstawowe procesy wewnątrzkomórkowe, takie jak produkcja, degradacja czy transport, mogą być modelowane przy wykorzystaniu liniowych funkcji, gdzie, wraz ze wzrostem stężenia reagenta, wzrasta szybkość danej reakcji. Natomiast, reakcje enzymatyczne zazwyczaj mają tempo silnie zależne od stężenia reagenta (np. o charakterze krzywej Michaelisa-Menten), dlatego mogą być z dość dużą dokładnością przybliżone poprzez przełączenie pomiędzy podukładami. Tempo reakcji w podukładach jest uzależnione od stanu (aktywnego lub nieaktywnego) danego procesu.

Przykładem układu kawałkami liniowego może być model opisujący zmianę poziomu białek na drodze produkcji i degradacji. Model ten można zapisać w następujący sposób:

$$\frac{dx_i}{dt} = p_i(X) - d_i(X)x_i, \quad i = 1, ...n, \tag{2.4}$$

gdzie x_i to stężenie danego białka, p_i to współczynnik produkcji białka, d_i to współczynnik degradacji, natomiast $X = X(x)$ jest zbiorem zmiennych przełączających, których wartość zależy od stanu układu $\mathbf{x}$. Wszystkie zmienne są zależne tylko od procesów produkcji i degradacji, ale tempa tych procesów mogą być różne w zależności od liczności (lub stężeń) białek.

W układzie istnieje zbiór wartości progowych, oznaczanych jako θ_{ij}, gdzie i odpowiada zmiennej, a j jest numerem granicy dla danej zmiennej. Jeśli w układzie występuje tylko jedna wartość progowa dla danej zmiennej, ominięcie wartości j i zapisanie wyłącznie indeksu z numerem zmiennej Z_i pozwala na uproszczenie zapisu bez utraty jego jednoznaczności. Z tego względu, tam gdzie to możliwe, taka notacja jest stosowana w dalszej części rozprawy. Wartości progowe dzielą przestrzeń stanu na domeny regulatorowe, a w każdej z nich układ jest opisywany przez zbiór funkcji liniowych, a dokładnie afinicznych. Dla wartości progowej następuje zmiana struktury układu lub wartości parametrów, co powoduje nieciągłość pochodnych, przez co system staje się nieciągły.

W celu ułatwienia zapisu, do modelu kawałkami linowego można wprowadzić zmienne przełączające, oznaczane jako Z_{ij}. Zmienna przełączająca to zmienna boolowska, przyjmująca wartość 0 lub 1, w zależności od wartości zmiennej stanu x_i oraz znaku (+ lub -) w indeksie górnym. Znak dodatni oznacza aktywację procesu przy wzroście poziomu powyżej wartości granicznej (równanie (2.5)), natomiast znak ujemny odpowiada dezaktywacji procesu, przy podwyższeniu poziomu powyżej wartości granicznej zmiennej (równanie (2.6)).

$$Z_{ij}^{+} = \begin{cases} 0 & \text{dla } x_i < \theta_{ij} \\ 1 & \text{dla } x_i \geqslant \theta_{ij}, \end{cases} \qquad (2.5)$$

$$Z_{ij}^{-} = \begin{cases} 1 & \text{dla } x_i < \theta_{ij} \\ 0 & \text{dla } x_i \geqslant \theta_{ij}. \end{cases} \qquad (2.6)$$

Zmienne przełączające są wykorzystywane do stworzenia skondensowanego opisu kompletnego układu. Dzięki wymnożeniu przez zmienną przełączającą, parametry w poszczególnych domenach przyjmują różne wartości. Rozpatrzmy prosty model produkcji dwóch białek (x_1 i x_2):

$$\frac{dx_1}{dt} = p_1 + p_{12} Z_2^{-} - d_1 x_1, \qquad (2.7)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = p_2 + p_{21} Z_1^{+} - d_2 x_2. \qquad (2.8)$$

W powyższym przykładzie każda zmienna ma po jednej wartości progowej: odpowiednio θ_1 oraz θ_2. Aktywacja indukowanej produkcji białka x_1 występuje dla stężenia białka x_2 o wartości poniżej wartości granicznej (θ_2). Natomiast wzrost stężenie białka x_1 powyżej wartości progowej θ_1 powoduje wzrost tempa produkcji białka x_2. Tempo degradacji białek jest stałe, niezależne od domeny, w której znajduje się układ.

2.4 Układy z przełączeniami a układy biologiczne

Modele systemów biologicznych mogą być tworzone na różnych poziomach złożoności, rozpoczynając od modeli populacyjnych opisujących zachowanie się grup ludzi lub zwierząt [19], poprzez modele funkcjonowania organizmów (np. organizmu ludzkiego [20]), modele oddziaływań międzykomórkowych [21], kończąc na modelach sieci genowo-białkowych w komórce [22, 23]. Na wszystkich stopniach złożoności, modele biologiczne charakteryzuje skomplikowana struktura [24]. Szczególnie trudne w opisie i analizie są układy wewnątrzkomórkowe, ponieważ są bardzo skomplikowane i zawierają oddziaływania pomiędzy wieloma różnymi związkami. Natomiast badania eksperymentalne, które pozwalają badać procesy wewnątrzkomórkowe, są złożone, czasochłonne, drogie i mają ograniczoną dokładność. Ponadto metody pozwalające na określenie stężenia niektórych cząsteczek, ich specyficznych

form (np. formy ufosforylowanej (aktywnej) danego białka) lub w konkretnej lokalizacji są wciąż niedoskonałe, a ich dokładność mocno ograniczona. Komórki w hodowlach komórkowych są bardzo wrażliwe na czynniki zewnętrzne, a otrzymane wyniki często są charakterystyczne wyłącznie dla danej linii komórkowej. Z tego powodu badania *in silico* sieci genowo-białkowych stanowią znaczące wsparcie w poznawaniu budowy i właściwości dynamicznych układów biologicznych oraz silnie wspierają ich analizę i testowanie hipotez.

W regulacyjnych układach genowo-białkowych występują zmiany zachowania układu wynikające ze stężeń substancji wewnątrzkomórkowych. Modelowanie matematyczne systemów biologicznych stanowi wyzwanie, ze względu na konieczność znalezienia kompromisu pomiędzy stopniem skomplikowania modelu, a jego dokładnością. Bardziej złożone modele pozwalają na uzyskanie dokładniejszego odwzorowania zachowania komórki, ale jednocześnie są trudniejsze w opracowaniu i analizie. Natomiast mniej skomplikowane modele są łatwiejsze w tworzeniu i interpretacji, ale są mniej dokładne. Zdecydowaną większość modeli biologicznych stanowią ciągłe modele, zawierające silne nieliniowości, które pozwalają na odwzorowanie skomplikowanej dynamiki rzeczywistych systemów. Jednakże analiza takich modeli jest nietrywialna, rozwiązanie zaś uzyskuje się poprzez symulacje numeryczne, jak np. w [25, 22]. Zastosowanie układu z przełączeniami do opisu układu genowo-białkowego może być kompromisem, pozwalającym odwzorować całościowe skomplikowanie systemu poprzez przełączenia, przy zachowaniu prostoty opisu podsystemów równaniami liniowymi. W dalszej części podrozdziału 2.4 przedstawiona została charakterystyka układów biologicznych ze szczególnym uwzględnieniem ich cech, potwierdzających zasadność stosowania układów z przełączeniami do odwzorowania dynamiki sieci wewnątrzkomórkowych.

2.4.1 Zróżnicowanie środowiska wewnątrzkomórkowego

Jedna z wielu trudności w modelowaniu systemów wewnątrzkomórkowych wynika z bardzo szerokiego zakresu liczności cząsteczek w komórce: od małolicznych genów (w większości przypadków w komórce występują dwie kopie danego genu), poprzez mRNA, występujące w kilkuset kopiach, po białka występujące w bardzo dużych stężeniach mogących sięgać setek tysięcy cząsteczek w jednej komórce. Modelowanie deterministyczne stanu genów jest obarczone dużym błędem, wynikającym z ich małej liczby, a błąd jest odwrotnie proporcjonalny do liczy cząsteczek danej zmiennej. Natomiast modelowanie stochastyczne układów złożonych z wielu równań opisujących bardzo liczne substancje jest bardzo czasochłonne i generuje ogromne ilości danych. Jedną z metod rozwiązania tego problemu jest tworzenie modeli hybrydowych, łączących modelowanie stochastyczne i deterministyczne [26]. Innym podejściem jest zastosowanie układów z przełączeniami, które pozwalają podzielić układ na część ciągłą oraz dyskretną. Ciągła część układu może być wykorzystana m.in. do opisu zmiany stężenia białka. Natomiast, dyskretna część pozwala opisać nagłe zmiany w układzie, takie jak skokowa zmiana stanu genu. W tym podejściu, zmiana liczby aktywnych genów jest modelowana jako przełączenie, skutkujące zmianą stanu układu, a w efekcie zmianą wartości parametru określającego tempo produkcji mRNA.

2.4.2 Proces produkcji białka

Podstawowym elementem każdej sieci wewnątrzkomórkowej są białka, które mogą pełnić funkcje budulcowe, enzymatyczne, transportowe, magazynujące, regulatorowe oraz wiele innych [27]. Proces produkcji białka jest złożony i wieloetapowy, jego prawidłowy przebieg jest kluczowy dla poprawnego funkcjonowania komórki, jak i całego organizmu. Informacja

na temat budowy białek jest zawarta w materiale genetycznym w postaci genów. Każdy gen jest nośnikiem informacji genetycznej o budowie jednego białka, przy czym postępy biologii molekularnej dowodzą zjawisk takich jak alternatywny *splicing*, który pozwala na powstanie różnych izoform białka z jednego genu [28]. Geny, poza nielicznymi wyjątkami, występują w dwóch kopiach, które w przeważającej większości czasu są w stanie nieaktywnym [29]. Aktywacja genu jest procesem bardzo skomplikowanym i zachodzi pod wpływem czynników transkrypcyjnych oraz szeregu innych enzymów. Aktywny gen ulega transkrypcji, czyli przepisaniu informacji genetycznej na mRNA, które po obróbce i transporcie do cytoplazmy pełni funkcję matrycy do produkcji białka, w procesie nazywanym translacją. Zsyntetyzowana cząsteczka białka przechodzi przez szereg procesów, takich jak odpowiednie fałdowanie i przyłączanie grup funkcyjnych, które kończy proces jego powstawania [30]. Skokowy charakter procesu aktywacji genu sprawia, że proces ten może być modelowany jako przełączenie w układzie kawałkami liniowym. Ponadto aktywacja i dezaktywacja genu przekłada się również na gwałtowną zmianę tempa produkcji mRNA, a następnie białka, co również może być modelowane, jako zmiana wartości parametrów w układzie z przełączeniami.

2.4.3 Regulacja procesów wewnątrzkomórkowych

Większość procesów wewnątrzkomórkowych nie zachodzi samorzutnie, ale wymaga obecności cząsteczek regulujących ich przebieg. Obecność cząsteczek regulatorowych zwiększa stopień skomplikowania dynamiki procesu, przez co funkcje stosowane do opisu takich zjawisk mają różny stopień złożoności.

Prawo działania mas

Przykładowo, podstawowe prawo wykorzystywane podczas tworzenia równań opisujących tempo reakcji to znane z chemii oraz biochemii prawo działania mas [18]. Prawo to mówi, że wraz ze wzrostem stężenia reagentów wzrasta szybkość reakcji. Przykładowa reakcja dwóch związków X i Y skutkująca powstaniem produktu P może być zapisana następująco:

$$X + Y \rightarrow P.$$

Zmiana stężenia substancji P w czasie może być opisana poprzez równanie różniczkowe:

$$\frac{d[P]}{dt} = k\,[X]\,[Y], \tag{2.9}$$

gdzie k to współczynnik szybkości reakcji, a $[X]$ i $[Y]$ to stężenia odpowiednich reagentów.

Reakcje enzymatyczne opisane funkcją Michaelisa-Menten

Większość procesów biologicznych jest katalizowana przez różnego rodzaju cząsteczki regulatorowe (np. enzymy, cząsteczki nieorganiczne, jony). Zależność tempa reakcji od stężenia substratów oraz cząsteczek regulatorowych jest opisywana przez różnorodne, silnie nielinowe, często sigmoidalne funkcje. Tempo reakcji enzymatycznej jest uzależnione zarówno od rodzaju enzymu, jak i liczby cząsteczek substratu. Podstawowy przebieg reakcji enzymatycznej (opisanej np. w [27]) jest następujący: enzym (E) łączy się z substratem (S), aby katalizować reakcję, powstaje kompleks enzym–substrat (ES), zachodzi reakcja i powstaje produkt (P), a następnie enzym jest uwalniany z kompleksu. Uwolniony enzym

może wiązać następną cząsteczkę substratu i katalizować kolejną reakcję. Schemat reakcji enzymatycznej zapisuje się w następująco:

$$E + S \longleftrightarrow ES \rightarrow E + P.$$

Jedną z podstawowych funkcji wykorzystywanych do opisu reakcji enzymatycznych jest funkcja Michaelisa-Menten [31], określająca tempo reakcji w zależności od stężenia substratu S oraz stałej K:

$$v = v_{max}\frac{[S]}{K + [S]}, \tag{2.10}$$

gdzie v_{max} to maksymalne tempo powstawania produktu. Dla stałego stężenia enzymów w komórce, szybkość reakcji zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia substratu. Początkowo, wzrost tempa reakcji jest liniowy, wprost proporcjonalny do stężenia substratu. Wraz z wyrównywaniem się liczby cząsteczek substratu i enzymu w układzie, wzrost tempa reakcji jest coraz mniejszy, a przy dużych stężeniach substratu osiąga wartość maksymalną V_{max} [32]. Wszystkie enzymy połączone są wówczas w kompleksy z substratami, a szybkość tworzenia produktu zależy tylko od szybkości przemiany substratu w produkt. Bezpośrednią miarą siły wiązania substratu przez enzym jest stała K, która odpowiada stężeniu substratu, dla jakiego tempo reakcji jest równe połowie tempa maksymalnego [27]. Wykres krzywej Michaelisa-Menten jest przedstawiony na Rysunku 2.3 niebieską linią. Równanie różniczkowe opisujące zmianę liczby cząsteczek produktu P w zależności od stężenia substratu w reakcji enzymatycznej opisanej równaniem Michaelisa-Menten przyjmuje następującą formę:

$$\frac{d[P]}{dt} = v_{max}\frac{[S]}{K + [S]}. \tag{2.11}$$

Funkcja Hilla

Kolejnym przykładem funkcji wykorzystywanej do modelowania procesów enzymatycznych jest funkcja A. Hilla [33]. Funkcja ta została zaproponowana w 1910 roku przez Hilla do opisu przyłączenia się tlenu do hemoglobiny. Hemoglobina ma kilka miejsc wiążących tlen, a efektywność przyłączenia kolejnych cząsteczek wzrasta wraz z licznością ligandów. Hill w swojej pracy [33] proponuje funkcję, która opisuje frakcję cząsteczek hemoglobiny wysyconej przez ligand, jako funkcję stężenia liganda ($[L]$):

$$y = 100\frac{K[L]^n}{1 + K[L]^n}, \tag{2.12}$$

gdzie y to frakcja enzymu, w tym przypadku hemoglobiny, która jest połączona z ligandem (tlenem), a K to stała reakcji (analogiczna do stałej Michaelisa-Menten). Funkcja ta ma kształt sigmoidalny, o stopniu nachylenia zwiększającym się wraz z wartością parametru Hilla n. Wartość funkcji Hilla w zależności od liczby cząsteczek liganda (substratu) dla małej i dużej wartości parametru n (odpowiednio 2 i 10) jest przedstawiona na Rysunku 2.3 zieloną i różową linią. Widoczny jest bardzo silnie skokowy charakter funkcji przy wysokiej wartości n.

Równanie Hilla często jest wykorzystywane w tworzeniu modeli matematycznych, szczególnie do opisu produkcji białka. W podejściu tym zakłada się, że gen jest aktywowany przez czynniki transkrypcyjne, a ze względu na występowanie kilku miejsc wiązania, tempo produkcji jest nieliniowo zależne od liczby cząsteczek czynnika transkrypcyjnyego w

komórce. Zmiana stężenia białka $[P]$ (przy pominięciu degradacji) może być opisana równaniem:

$$\frac{d[P]}{dt} = k\frac{[Y]^n}{K^n + [Y]^n}, \tag{2.13}$$

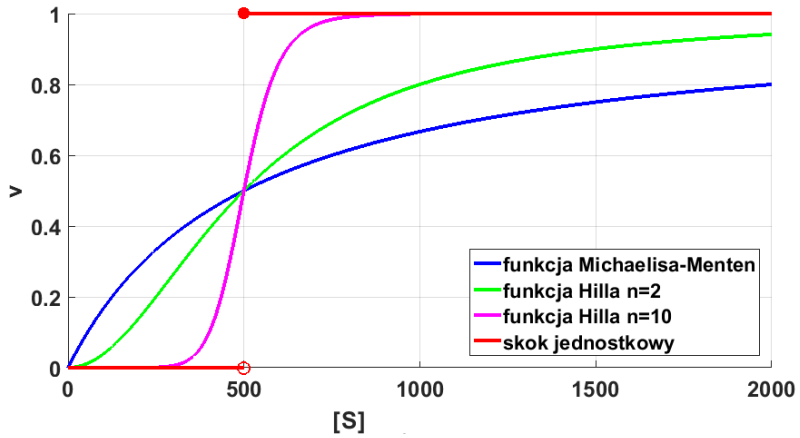
gdzie Y to liczba cząsteczek czynnika transkrypcyjnego, a k to maksymalne tempo produkcji białka. Podobne równanie można zastosować do procesu produkcji białka represowanego przez czynnik transkrypcyjny – przyłączenie cząsteczek liganda do DNA zmniejsza produkcję białka:

$$\frac{d[P]}{dt} = k\frac{K^n}{K^n + [Y]^n}. \tag{2.14}$$

Procesy biologiczne, silnie zależne od obecności enzymu, o dynamice opisywanej krzywymi sigmoidalnymi, takimi jak funkcja Hilla, można przybliżać poprzez funkcję skokową. Układ taki sprowadza się wtedy do układu z przełączeniem wartości parametru: poniżej wartości progowej proces zachodzi z niskim tempem reakcji, natomiast nagromadzenie enzymów w układzie i przekroczenie wartości progowej powoduje wzrost tempa reakcji do jej wartości maksymalnej (Rysunek 2.3). Podział systemu na dwa podsystemy, pozwala opisać zachowanie układu zarówno przy niskim, jak i wysokim stężeniu enzymu, wykorzystując jedynie proste liniowe funkcje oraz przełączenie.

2.4.4 Sprzężenia zwrotne

Prawidłowe funkcjonowanie organizmu jest warunkowane przez zdolność do utrzymania homeostazy, czyli stałych warunków wewnętrznych. Autoregulacja systemów wewnątrzkomórkowych jest możliwa dzięki ujemnym sprzężeniom zwrotnym, w których dane białko pośrednio lub bezpośrednio reguluje swój poziom. Sprzężenia ujemne pozwalają na powrót do normalnego poziomu białka po wystąpieniu zewnętrznych wymuszeń lub zakłóceń [34]. W układach biologicznych są obecne również sprzężenia zwrotne dodatnie, które ułatwiają propagację sygnału w komórce, poprzez wprowadzenie wzmocnienia. Przykładowo,

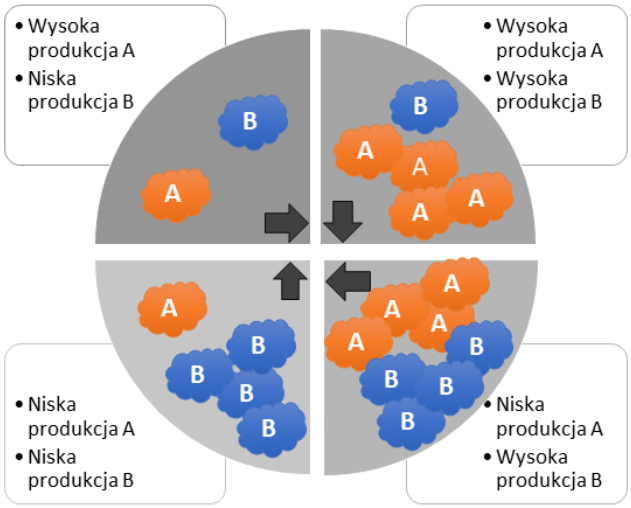


Rysunek 2.3: Tempo reakcji (v) w zależności od stężenia substratu ($[S]$) opisane funkcjami: skokową, Michaelisa-Menten oraz Hilla o $n = 2$ i $n = 10$

sprzężenia dodatnie są główną składową różnych kaskad aktywacyjnych, multiplikujących odpowiedź komórki na pojedyncze bodźce [35]. Sprzężenia dodatnie wprowadzają również bistabilność układów, pozwalając na podejmowanie decyzji np. o przeżyciu lub śmierci komórki.

Sprzężenia zwrotne mogą oddziaływać poprzez regulację produkcji białka (indukcję aktywacji lub dezaktywacji genów, przyśpieszanie procesu transkrypcji lub translacji) lub przez regulację tempa degradacji białka lub mRNA. Należy zauważyć, że bezpośrednie oddziaływanie białka na proces swojej produkcji lub degradacji jest raczej rzadkie i najczęściej regulacja wymaga obecności cząsteczek pośredniczących, takich jak enzymy regulatorowe [27]. Ponadto sprzężenia dodatnie są często realizowane poprzez podwójną negację, czyli poprzez blokadę swojego własnego inhibitora, tak jak ma to miejsce w przypadku białka p53 [36].

W układach z przełączeniami można łatwo modelować sprzężenia zwrotne poprzez podział przestrzeni stanu na różne podsystemy, w których procesy zachodzą z podstawowym lub indukowanym tempem reakcji. Przykładem może być układ dwóch białek ze sprzężeniem ujemnym, który można podzielić na 4 podsystemy (Rysunek 2.4). Przy niskich poziomach obu białek następuje szybka produkcja białka A, które po skumulowaniu aktywuje indukowaną produkcję białka B, co modelowane jest jako przejście do innej domeny. Po przekroczeniu wartości progowej dla białka B, układ przechodzi do domeny, w której produkcja białka A jest zahamowana. Następuje obniżenie poziomu białka A, przez co układ przechodzi do domeny z niskim poziomem białka A i wysokim poziomem białka B, w której produkcja białka B jest wolna. Powoduje to spadek poziomu białka B i powrót do domeny z niskimi poziomami obu białek. W tak stworzonym układzie, sprzężenie ujemne jest zamodelowane poprzez zmianę tempa produkcji białek w 4 podsystemach.



Rysunek 2.4: Schemat przykładowego systemu z ujemnym sprzężeniem zwrotnym; A, B - białka, liczba cząsteczek odwzorowuje małą i dużą liczność białek w podsystemie

2.4.5 Stochastyczność procesów biologicznych

Przebieg reakcji biochemicznych w komórkach jest zależny od szeregu różnych czynników, zarówno fizycznych (np. temperatura i ciśnienie), jak i chemicznych (np. odczyn pH, enzymy, nieorganiczne katalizatory). W każdej populacji komórkowej, nawet wśród komórek należących do tej samej linii, każda komórka ma charakterystyczne dla siebie właściwości wynikające ze stężenia substancji wewnątrzkomórkowych, charakterystyki fizyko-chemicznej, podatności na czynniki środowiskowe oraz losowości procesów. Ze względu na zróżnicowanie właściwości komórek w danej populacji, obserwuje się różne odpowiedzi na te same czynniki zewnętrzne. Przykładowo, w eksperymentach biologicznych prowadzonych na jednolitej populacji komórkowej, po zadziałaniu czynnikiem stresowym, np. promieniowaniem jonizującym, występują różne typy zachowania komórek — część komórek umiera, część aktywuje blokadę cyklu komórkowego i naprawę uszkodzeń, a część prowadzi normalną proliferację. Ponadto komórki różnią się między sobą dynamiką procesów i czasem aktywacji poszczególnych reakcji — część komórek reaguje bardzo szybko na czynniki zewnętrzne, a niektóre dopiero po dłuższym czasie aktywują odpowiedź.

Badanie symulacyjne właściwości populacji komórkowych, na poziomie pojedynczych komórek jest możliwe poprzez zastosowanie modeli uwzględniających stochastyczność procesów, która pozwala na uzyskanie zróżnicowanych odpowiedzi na ten sam bodziec, startując z tych samych warunków początkowych modelu. Każdorazową symulację takiego modelu możemy traktować jako odpowiedź pojedynczej komórki. Standardowym podejściem do modelowania procesów stochastycznych w układach biologicznych jest zastosowanie algorytmu Gillespiego [37] i różnych jego modyfikacji. Natomiast, w układach z przełączeniami istnieje możliwość stworzenia heterogenicznej populacji, na przykład poprzez wprowadzenie różnej lokalizacji wartości progowych, co odzwierciedla różną wrażliwość komórek na obecność czynników regulatorowych w komórce. W efekcie czego w populacji komórkowej procesy są aktywowane przy różnych stężeniach substancji regulatorowych, co skutkuje zróżnicowaniem odpowiedzi na ten sam bodziec.

Ponadto w układach kawałkami liniowych istnieje możliwość badania wpływu losowości aktywacji oraz dezaktywacji procesów kontrolowanych przez czynniki regulatorowe. Natura procesów biochemicznych zachodzących w komórkach, podobnie jak wszystkich procesów chemicznych, jest losowa, zależna od chaotycznych ruchów cząsteczek. Oczywiście, wraz ze wzrostem liczby cząsteczek enzymu w układzie, wzrasta prawdopodobieństwo aktywacji danego procesu. Aby zamodelować losowość aktywacji/dezaktywacji procesu można wprowadzić do układów z przełączeniami funkcje losowe, określające prawdopodobieństwo występowania procesu w stanie aktywnym. Zatem przełączenie między domenami (zarówno czas przełączenia, jak i aktywny podsystem) może być wyznaczane losowo z prawdopodobieństwem zależnym od poziomu poziomu danego czynnika regulatorowego.

2.4.6 Wartości parametrów reakcji

Jednym z głównych problemów podczas tworzenia modeli jest dobranie wartości parametrów. Wynika to, m.in. z faktu że do odtworzenia kompleksowej dynamiki systemów biologicznych, konieczne jest stworzenie skomplikowanych, nieliniowych układów. W przypadku modeli nieliniowych, należy dobrać odpowiednią funkcję nieliniową oraz jej parametry, które często nie mają bezpośredniego przełożenia na procesy biologiczne. Również wartości współczynnika Hilla dobierane są często eksperymentalnie, bez biologicznego uzasadnienia tak, aby uzyskać odpowiednią dynamikę procesu. Ponadto w niektórych funkcjach wpływ

parametrów na poziom danego białka nie jest intuicyjny, a określenie zmiany zachowania, po wprowadzeniu zmian do modelu, jest możliwe dopiero po wykonaniu symulacji.

W modelach kawałkami liniowych występują jedynie liniowe zależności, dzięki czemu można ograniczyć liczbę parametrów w układzie. W dodatku, parametry modelu liniowego mają proste znaczenie biologiczne, takie jak tempo produkcji, degradacji czy transportu. Wadą takiego podejścia jest konieczność znalezienia progów, które dzielą przestrzeń stanu na podukłady. Tym nie mniej, w modelach nieliniowych (wykorzystujących opis za pomocą równania Hilla lub równania Michaelisa-Menten) również konieczne jest określenie wartości stałej K, która może odpowiadać wartości progowej w modelu kawałkami liniowym. Podział przestrzeni stanu wartościami progowymi łatwiej jest odnieść do wyników eksperymentów biologicznych, ponieważ wyniki pomiarów poziomów białek, mRNA i innych cząsteczek, w eksperymentach biologicznych określone są często jakościowo, a nie ilościowo. Różnica pomiędzy niskim a wysokim poziomem białka jest na tyle znacząca, że możliwe jest na jej podstawie odpowiednie umiejscowienie progu. Przykładowo, wyniki eksperymentu *Western Blot* lub PCR nie podają dokładnej liczby cząsteczek w danej komórce, ale są obrazem całej populacji, w której poziom danego związku jest określany jakościowo (niski/średni/wysoki) lub poprzez stosunek względem kontroli. Wyniki eksperymentu *Western Blot* w postaci zdjęcia wybarwionego żelu po elektroforezie często są zamieszczone w publikacjach, jako dowód występowania danego białka, ale nie ma możliwości na jego podstawie określić dokładnej liczebności lub stężenia białka. Na przykład w pracy [38] przedstawiony jest wynik semi-jakościowej analizy wyników eksperymentu *Western Blot*, gdzie na podstawie zdjęcia prążków białka p53 i S392A w różnych układach eksperymentalnych i powtórzeniach szacowny jest względny poziom białek w komórkach.

Wyniki takie jest łatwiej wykorzystać w modelach kawałkami liniowych, gdzie niskie i wysokie stężenie białka odpowiada dwóm różnym podukładom, w których reakcja, zachodzi kilkukrotnie szybciej, gdy poziom białka jest wysoki lub wolniej, gdy jest niski. Każdy podukład odpowiada innej dynamice systemu biologicznego i jest opisywany przez stosunkowo prosty model. Dopiero pełny model, składający się z wielu podukładów opisuje skomplikowaną dynamikę rzeczywistego systemu biologicznego.

2.4.7 Przełączenia w układach biologicznych

Układy kawałkami liniowe można wykorzystać do modelowania systemów biologicznych, ponieważ dużą część procesów wewnątrzkomórkowych, tj. produkcję, degradację czy transport białka, można opisać przez proste liniowe zależności. Stopień skomplikowania układu wzrasta, gdy uwzględniamy regulację procesów, tym bardziej że kinetyka reakcji enzymatycznych jest bardzo silnie nieliniowa. Jeśli w komórce nie występuje enzym, reakcja enzymatyczna nie może zajść, ze względu na niekorzystny bilans energetyczny. Wraz ze wzrostem liczby cząsteczek enzymu w komórce, tempo reakcji wzrasta w sposób silnie nieliniowy, aż do wartości maksymalnej, wynikającej z właściwości komórki [27]. Stan komórki, z obecnym i nieobecnym enzymem, może być modelowany jako dwa podukłady w systemach z przełączeniami. Oczywiście, w tych podukładach tempo procesów, zależnych od danego enzymu, będzie się znacząco różniło.

W celu zobrazowania metod oraz porównania wyników modelowania układów biologicznych przy wykorzystaniu funkcji nieliniowych oraz funkcji liniowych z przełączeniami, przedstawiłam poniżej zastosowanie obydwóch podejść do opisu prostego układu produkcji białka. Przykładowy układ biologiczny to sieć powiązań między dwoma białkami, gdzie

jedno pełni rolę czynnika transkrypcyjnego dla drugiego. Białko Y to czynnik transkrypcyjny, którego produkcja i degradacja zachodzi ze stałym tempem. Natomiast białko X jest zależne transkrypcyjnie od białka Y, a jego produkcja jest opisana nieliniową zależnością. Model nieliniowy takiego układu może przyjąć następującą postać:

$$\frac{dY}{dt} = p_1 - d_1 Y, \tag{2.15}$$

$$\frac{dX}{dt} = p_2 \frac{Y^n}{K^n + Y^n} - d_2 X. \tag{2.16}$$

Wartości i znaczenie parametrów są przedstawione w Tabeli 2.1, natomiast odpowiadający model kawałkami liniowy z przełączeniami może być zapisany jako:

$$\frac{dY}{dt} = p_1 - d_1 Y, \tag{2.17}$$

$$\frac{dX}{dt} = p_2 Z_Y^+ - d_2 X, \tag{2.18}$$

gdzie

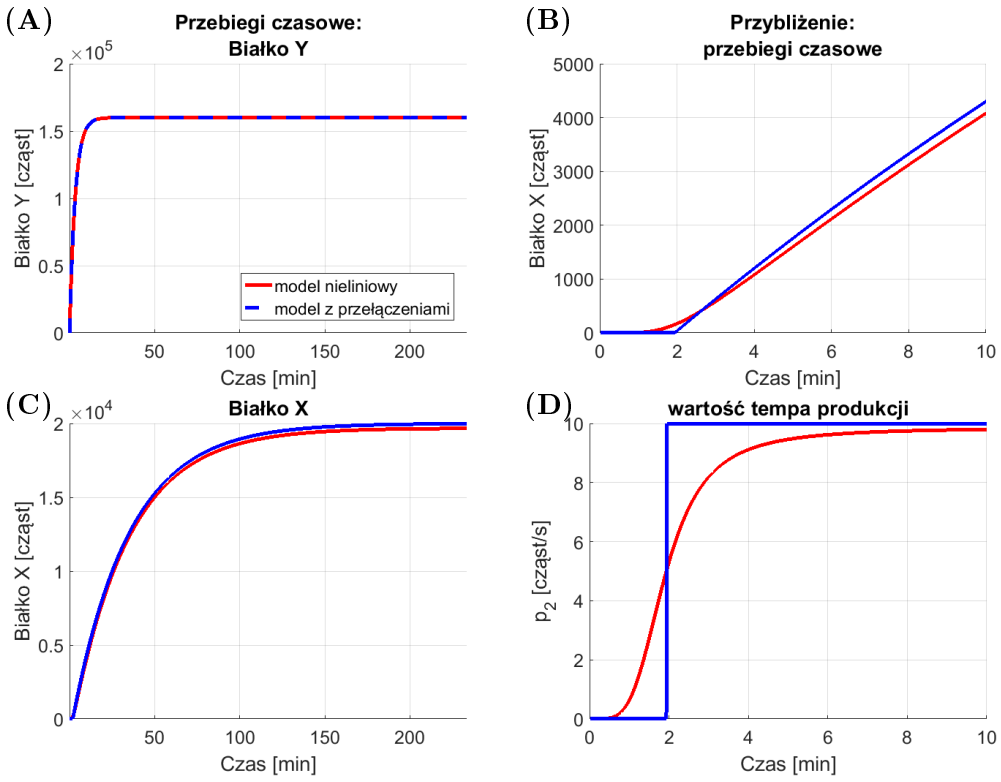
$$Z_Y^+ = \begin{cases} 0 & \text{dla } Y < \theta_Y \\ 1 & \text{dla } Y \geqslant \theta_Y. \end{cases} \tag{2.19}$$

Wartość progowa θ_Y, przy której zachodzi aktywacja produkcji białka X, jest równa wartości stałej K. Przebiegi czasowe obu modeli są przedstawione na Rysunku 2.5. Przebiegi czasowe białka Y są takie same w obu modelach (Rysunek 2.5A), natomiast poziom białka X w obu modelach nieznacznie się różni (Rysunek 2.5C). Na wykresach w prawej kolumnie przedstawionych jest pierwszych 10 minut symulacji. Na Rysunku 2.5D widać moment przełączenia się wartości tempa produkcji białka p_2 w modelu z przełączeniami oraz gwałtowną, nieliniową zmianę tempa produkcji w modelu nieliniowym. Pomimo znacznej różnicy wartości tempa produkcji w obu modelach, odpowiedź modelu nieliniowego i modelu z przełączeniami jest bardzo podobna, co sugeruje, że obydwa podejścia mogą być efektywnie wykorzystywane do modelowania dynamiki procesów biologicznych.

Kolejnym przykładem przełączenia występującego w układzie biologicznym jest oddziaływanie zewnętrzne, takie jak gwałtowna zmiana warunków środowiska (wzrost lub spadek temperatury, pojawienie się toksyn) lub podanie leku. Przełączenia takie powodują skokową zmianę zachowania układu rzeczywistego, co może być modelowane jako przełączenie w modelu matematycznym, gdzie zmianie może ulec zarówno struktura, jak i parametry układu [39].

Powyższy układ eksperymentalny można zmodyfikować poprzez dodanie terapii, która ma na celu obniżenie poziomu białka X poniżej założonej wartości granicznej. Cel ten może być realizowany poprzez podanie leku, który wywołuje degradację czynnika transkrypcyjnego Y, skutkując tym samym brakiem produkcji białka X. W celu wprowadzenia terapii do analizowanych modeli, należy zmodyfikować równania, opisujące produkcję białka Y, poprzez dodanie członu opisującego degradację indukowaną przez lek. Zarówno równanie (2.15), jak i (2.17) przybiorą następującą formę:

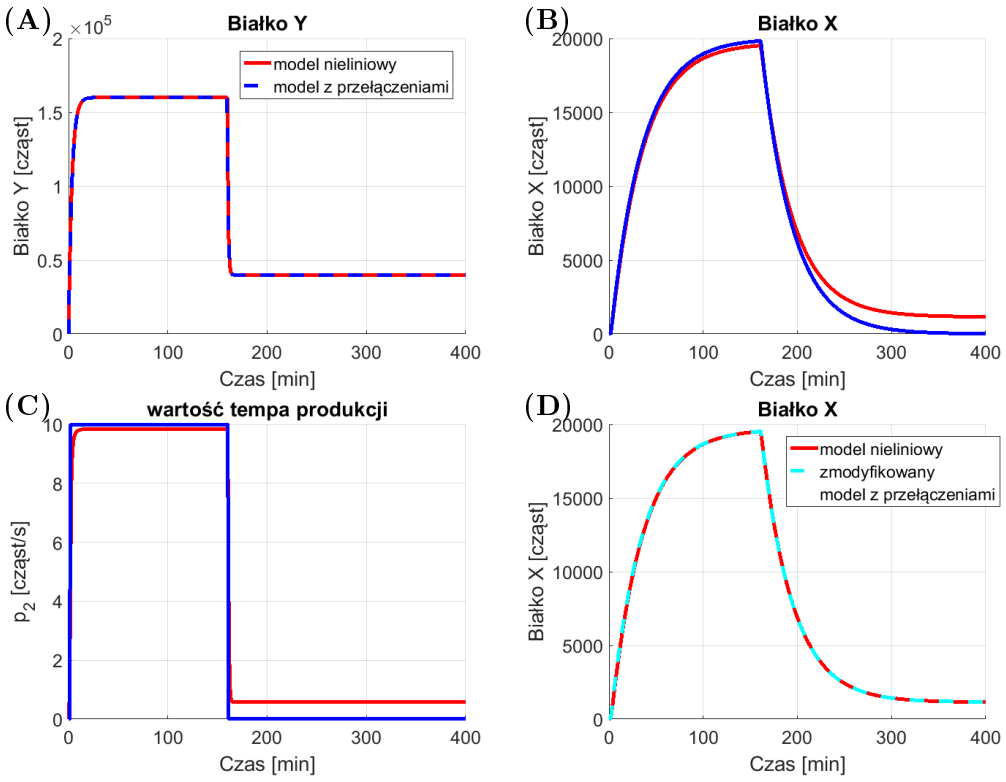
$$\frac{dY}{dt} = p_1 - d_1 Y - d_d Y(t > t_d), \tag{2.20}$$



Rysunek 2.5: Porównanie wyników modelu sieci dwóch białek: nieliniowego (czerwony) i z przełączeniami (niebieski); (A) Przebiegi czasowe białka Y; (B) Przybliżenie (10 min) przebiegów czasowych białka X; (C) Przebiegi czasowe białka X. (D) Zmiana wartości tempa produkcji białka X w czasie pierwszych 10 min

gdzie d_d to degradacja indukowana przez lek, a t_d to czas podania leku. Po podaniu leku, w 160 minucie symulacji poziom białka Y gwałtownie spada (Rysunek 2.6A), co powoduje zmianę tempa produkcji białka X (Rysunek 2.6C). W obu modelach tempo produkcji białka X spada gwałtownie do niskich wartości, ale w modelu z przełączeniami osiąga wartość 0, a w modelu nieliniowym stabilizuje się na wartości 0.5743 $\frac{1}{s}$. W efekcie, końcowy poziom białka X w modelu nieliniowym jest wyższy, niż w modelu z przełączeniami (Rysunek 2.6B). Jeśli poziom białka Y, po podaniu leku spadałby do 0, to poziom białka X w stanie stacjonarnym, byłby taki sam w obu modelach. Aby uzyskać w modelu z przełączeniami poziomy białka X w stanie stacjonarnym identyczne z poziomami w modelu nieliniowym, konieczne byłoby odpowiednie dobranie wartości parametrów produkcji białka w domenach. Tempo produkcji białka w domenie z niskim poziomem Y powinno być równe 0.5743 $\frac{1}{s}$, natomiast w domenie z wysokim poziomem Y – 9.842 $\frac{1}{s}$. Przebieg czasowy takiego modelu z przełączeniami porównany z modelem nieliniowym jest przedstawiony na Rysunku 2.6D.

Różnice, występujące między modelem z przełączeniami a jego nieliniowym analogiem, będą zależne od stopnia skośności funkcji nieliniowej oraz zakresu zmienności zmiennych, jednak ogólna dynamika układu została poprawnie odwzorowana w obu przypadkach. To, które podejście jest lepsze, zależy od badanego układu oraz zastosowań modelu.



Rysunek 2.6: Porównanie wyników modelu dwóch białek: nieliniowego (czerwony) i z przełączeniami (niebieski) po podaniu leku; A. Przebiegi czasowe białka Y; B. Przebiegi czasowe białka X; C. Zmiana wartości tempa produkcji białka X w czasie; D. Przebiegi czasowe białka Y w zmodyfikowanym modelu z przełączeniami

Tabela 2.1: Znaczenie i wartości parametrów modelu produkcji białka zależnego od czynników transkrypcyjnych

Parametr	Opis	Wartość	Jednostka
p_1	tempo produkcji białka Y	800	$1/s$
p_2	tempo produkcji białka X	10	$1/s$
d_1	tempo degradacji białka Y	$5 \cdot 10^{-3}$	$1/s$
d_2	tempo degradacji białka X	$5 \cdot 10^{-4}$	$1/s$
d_d	tempo degradacji białka Y indukowanej przez lek	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$1/s$
n	współczynnik Hilla	5	[bw]
K	stała Michaelisa-Menten	$7 \cdot 10^4$	cząsteczek
θ_Y	wartość progowa Y	$7 \cdot 10^4$	cząsteczek
t_d	czas podania leku	160	minut

2.5 Przegląd metod modelowania i analizy systemów biologicznych poprzez układy z przełączeniami

Ze względu na dużą złożoność systemów biologicznych oraz różne zastosowania budowanych modeli, istnieje wiele algorytmów pozwalających na modelowanie różnych aspektów funkcjonowania układów biologicznych. Przegląd takich metod przedstawiłam w artykule [40]. Jeśli celem modelowania jest scharakteryzowanie typowego działania systemu (średniego zachowania w populacji komórkowej), lepsze poznanie jego funkcjonowania oraz możliwych odpowiedzi na zadane wymuszenia, stosuje się modelowanie deterministyczne. Wynik takiego modelu może być utożsamiany z uśrednionym wynikiem symulacji całej populacji. Natomiast, do badania heterogenicznej odpowiedzi populacji komórkowej stosuje się algorytmy stochastyczne, które zawierają element losowości. Wynikiem algorytmów stochastycznych jest zróżnicowany zbiór przebiegów czasowych, charakteryzujący różne osobniki lub komórki w danej populacji.

Powszechnie stosowanym podejściem do modelowania procesów wewnątrzkomórkowych jest zastosowanie modeli z silnie nieliniowymi funkcjami, których analiza jest bardzo trudna i często opiera się wyłącznie na analizie numerycznych przebiegów czasowych. Jednakże w literaturze (omówionej w kolejnych rozdziałach) pojawiają się również doniesienia o możliwości zastosowania przełączeń, w miejsce silnie nieliniowych funkcji o charakterze sigmoidalnym do modelowania gwałtownych zmian zachowania lub stanu układu. Znane metody analizy ograniczają się głównie do wyznaczania punktów stacjonarnych układu. Ponadto w większości przypadków przedstawione algorytmy wymuszają bardzo ograniczoną strukturę układu. W kolejnych podpunktach omówiłam znane mi metody modelowania i analizy systemów biologicznych przy zastosowaniu układów z przełączeniami.

Modele deterministyczne z przełączeniami

Modele regulacji genowo-białkowej powstawały już w latach 70-tych. Przykładowo w pracy J. Tysona i H. Othmera z 1978 r. są przedstawione modele zawierające zarówno mRNA, cytoplazmatyczny mRNA, różne formy pośrednie białka, które jest enzymem. Modele zwierają także oddziaływanie ostatecznej formy enzymu na proces produkcji jądrowego mRNA [41]. Produkcja kolejnych form białka jest liniowo zależna wyłączenie od stężenia formy wcześniejszej, natomiast oddziaływanie enzymu na produkcję mRNA jest opisane funkcją nieliniową, sigmoidalną, o kształcie zależnym od rodzaju regulacji (ujemnej oraz dodatniej). Model ten zakłada, że stężenia enzymów, regulujących kolejne etapy produkcji białka, nie ulegają zmianom w czasie, dlatego też tempa produkcji są stałe. Oczywiście, w niektórych systemach to założenie jest dalekie od prawdy, dlatego wiele modeli uwzględnia nieliniowości w różnych procesach występujących w układzie. Upraszczając układ nieliniowy poprzez zastąpienie nieliniowości przełączeniami, otrzymuje się układ kawałkami liniowy. Dynamika takiego modelu jest podobna do analogicznego ciągłego układu nieliniowego, poza stanem układu bliskim wartości progowej, w którym następuje aktywacja/dezaktywacja procesu. Takie podejście zostało wykorzystane w niniejszej rozprawie doktorskiej, ponieważ umożliwia uproszczenie modeli i ich analizę, przy niewielkim ograniczeniu możliwości odwzorowania procesów biologicznych.

Jedną z cech analizowanego układu jest istnienie i położenie punktów równowagi. W 1993 roku E. Snoussi i R. Thomas [42] wprowadzili pojęcie dwóch typów punktów stacjonarnych: osobliwych (SSP) i zwyczajnych (RSP). Autorzy zbadali właściwości układów

z pętlami, które, w przypadku układów ze sprzężeniem dodatnim, są źródłem multistacjonarności (występowanie kilku punktów stacjonarnych), a w układach ze sprzężeniem ujemnym umożliwiają homeostazę.

Metodyka analizy układów kawałkami liniowych w zastosowaniach do systemów biologicznych była rozwijana po wprowadzeniu kolejnych założeń, mających na celu uproszczenie analizy. W tym celu równanie opisujące zmiany poziomu danej cząsteczki zostało sprowadzone do dwóch reakcji: produkcji i degradacji. W publikacji T. Mestla i in. z 1995 roku [17] omówiony jest problem określania występowania i lokalizacji punktów stacjonarnych w układach kawałkami liniowych. W tym przypadku stan zmiennej również jest opisywany przez równania produkcji oraz degradacji, przy czym parametry opisujące tempo obydwu procesów zależą od stanu układu. Wprowadzone jest dodatkowe założenie o występowaniu stałego, podstawowego tempa degradacji, które zapewnia stabilność modelu w poszczególnych podukładach. Jest to zgodne z wiedzą biologiczną, ponieważ wszystkie cząsteczki biologiczne po pewnym czasie się rozpadną, co jest określone przez okres półtrwania cząstek, który pozwala na wyliczenie współczynników degradacji. Algorytm wyznaczania osobliwych punktów stacjonarnych wymaga zastąpienia funkcji skokowej poprzez sigmoidalną funkcję ciągłą, dzięki czemu możliwe jest wyznaczenie pochodnych, które określają kierunek zmian trajektorii w momencie przechodzenia przez wartości progowe. Zaproponowana w tej pracy metodyka wykluczenia regionów, w których mogą występować punkty osobliwe, znacznie ułatwia badanie właściwości układu, jednakże może być wykorzystana jedynie w modelach, uwzględniających wyłącznie procesy produkcji i degradacji, co ma miejsce w wielu przypadkach.

W niektórych metodach analizy zakłada się stałą degradację, niezależną od stanu układu. Takie podejście jest prezentowane między innymi w pracy [43], gdzie badane są rozwiązania cykliczne w układach kawałkami liniowych ze stałym, równym tempem degradacji dla wszystkich zmiennych. Dla układów takich tworzony jest graf tranzycji, w którym określa się występowanie cykli — zamkniętych sekwencji przejścia pomiędzy podsystemami, które następnie są analizowane pod kątem stabilności ich trajektorii. Oczywiście zastosowanie stałego, równego tempa degradacji w rzeczywistych modelach biologicznych stanowi spore ograniczenie i nie jest uzasadnione z biologicznego punktu widzenia. Również w pracy R. Edwardsa z 2000 roku [44] zaproponowana została metoda analizy układów z przełączeniami, w których tempo degradacji jest stałe i równe dla wszystkich zmiennych, co znacząco upraszcza analizę, ale jednocześnie zmniejsza stosowalność takiego podejścia do rzeczywistych układów biologicznych. W jednej z nowszych prac E. Plahte i S. Kjøglum z 2005 roku [45], analityczne podejście do badania dynamiki wewnątrzkomórkowych sieci białkowych znajduje zastosowanie tylko w układach opisanych przez reakcje produkcji i degradacji. Metoda ta również wymaga zastąpienia funkcji skokowej poprzez jej liniowe, sigmoidalne przybliżenie. Zaproponowana metodologia pozwala na znalezienie rozwiązania układu ze skośnymi funkcjami sigmoidalnymi, również w przypadku występowania autoregulacji i ruchów poślizgowych na granicy.

Natomiast analiza modeli, zawierających poza prostymi funkcjami produkcji oraz degradacji również funkcje odpowiadające transportowi, czy produkcji kolejnych form cząsteczki, została zaproponowana w pracy E. Plathe i in. w 1998 roku [46]. W artykule przedstawiona jest procedura określania pozycji oraz stabilności osobliwych punktów stacjonarnych. Taka analiza pozwala na poznanie właściwości oddziaływania funkcji skokowych na dynamikę układu wokół punktów stacjonarnych. W podejściu tym zmienne dzielone są na pierwszorzędowe (ang. *primary*) i drugorzędowe (ang. *secondary*), a następnie wyznacza-

na jest macierz o specyficznej strukturze zawierająca pochodne po zmiennych pierwszo- i drugorzędowych. Ze względu na konieczność wyliczenia rozszerzenia wielomianu charakterystycznego macierzy pochodnych, obliczenia mogą być bardzo skomplikowane, szczególne w przypadku dużej liczby różnych przypadków do zbadania.

W niniejszej pracy nacisk został położony na analizę modeli jak najbardziej oddających rzeczywistość, dlatego zakładam wykorzystanie biologicznie uzasadnionych wartości parametrów, przez co wykluczone jest stosowanie metod zakładających stałe i jednakowe tempa degradacji jak w pracach [43, 44]. Ponadto w zaproponowanych modelach uwzględnione zostały również procesy transportu (z cytoplazmy do jądra) oraz produkcji białka na matrycy mRNA, które są kluczowe do odpowiedniego opisania dynamiki układów biologicznych. Metody wyznaczania osobliwych punktów stacjonarnych, zaproponowane w publikacjach [17, 45], mogą nie wykazać istnienia punktu SSP. Z tego powodu w niniejszej pracy zaproponowałam modyfikację metody wyznaczania Δ-regionów, w których mogą występować osobliwe punkty stacjonarne. Modyfikacja ta uwzględnienia nie tylko zależności zmiennych modelu od zmiennych przełączających, ale również zależności od innych zmiennych stanu.

Jakościowe algorytmy kawałkami liniowe

Układy kawałkami liniowe mogą być analizowane jakościowo, poprzez zdefiniowanie jakościowych stanów, które odpowiadają podukładom w przestrzeni stanu [47]. Algorytm symulacji jakościowych został zaproponowany przez B. Kuipersa w 1986 roku w artykule [48], natomiast w późniejszych latach pojawiła się propozycja zastosowania modelowania jakościowego do sieci genetycznych [49, 50]. W takich modelach, przejścia między jakościowymi stanami odpowiadają przejściu pomiędzy podukładami. Wartości parametrów w modelach jakościowych są określanie jakościowo, a nie ilościowo. Zaproponowane podejście pozwala na zastąpienie etapu estymacji parametrów, poprzez wyznaczenie jedynie stosunków pomiędzy nimi. Metoda ta również zawiera funkcje przełączające, które mogą uwzględniać wartość jednej lub kilku zmiennych. W poszczególnych podukładach model jest opisany przez okresowo ciągłe równania liniowe, zawierające człony opisujące procesy produkcji oraz degradacji. Celem symulacji jest określenie jakościowego zachowania układu, czyli sekwencji stanów jakościowych, dla wybranych warunków początkowych. Wśród możliwych zachowań układu można wyróżnić stabilizację w stanie równowagi oraz oscylacje w cyklach granicznych.

Praca H. de Jong z 2003 roku prezentuje oprogramowanie *Genetic Network Analyzer (GNA)*, które pozwala na modelowanie i symulacje sieci genowych poprzez modele jakościowe kawałkami liniowe [51]. Główną zaletą takiego podejścia jest brak konieczności określania konkretnych wartości parametrów. Jednakże dzięki bardzo szybkiemu rozwojowi metod eksperymentalnych, możliwe jest coraz dokładniejsze szacowanie wartości parametrów wykorzystywanych w modelach ilościowych. Ponadto modele ilościowe mają podstawową przewagę nad modelami jakościowymi, polegającą na możliwości tworzenia przebiegów czasowych, które można porównać do wyników biologicznych oraz możliwości określenia wymuszenia (np. dawki leku), wywołującego odpowiednią reakcję w układzie. Dodatkowo, metody analizy modeli ilościowych są znacznie bardziej rozwinięte w porównaniu do metod analizy modeli jakościowych.

Modele stochastyczne

Modele stochastyczne stanowią ważną część współczesnej biologii systemów, ze względu na możliwość uwzględnienia losowości procesów, co pozwala na badanie zróżnicowania populacji. Modele stochastyczne są stosowane w odniesieniu do różnych typów układów biologicznych, zarówno modeli epidemiologicznych, prezentujących różne zachowanie się osobników w populacji, jak i w modelach oddziaływań zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych, gdzie badane jest zróżnicowanie odpowiedzi na pewne bodźce. Przykładem połączenia modeli stochastycznych z układami z przełączeniami są modele kawałkami deterministyczne, oznaczane jako PDMP: *piecewise deterministic Markov processes*. Modele PDMP opisują procesy Markova składające się z mieszaniny zmian deterministycznych (ang. *deterministic motion*) i losowych przeskoków (ang. *random jumps*) [52]. Dany proces Markova należy do klasy PDMP, jeśli dla procesu $x(t), t \geqslant 0$ istnieje rosnąca sekwencja losowych czasów przełączeń (t_n), a stan układu w każdym interwale pomiędzy przeskokami (t_n, t_{n+1}) jest określony poprzez równania deterministyczne [53].

Istnieją różne typy modeli PDMP, które znajdują zastosowanie do różnych systemów biologicznych. W modelach typu *pure jump* proces jest stały pomiędzy przełączeniami, co może opisywać ruch konika polnego [53]. Natomiast w modelach typu *velocity jump* w chwili przeskoku zmianie ulega prędkość procesu, co może być wykorzystywane w modelach rozpraszania w systemach biologicznych: związków chemicznych, komórek czy organizmów – zwierząt [54]. Bardziej złożone modele typu *flow with jumps* opisują zachowanie układu poprzez ciągłe funkcje w czasie pomiędzy przeskokami. Przykładem zastosowania takich modeli są modele populacji uwzględniające podział komórki: wzrost komórki jest ciągłym procesem deterministycznym, natomiast podział jest skokowym zdarzeniem losowym [53]. Dodatkowo model może uwzględniać komórki różnego typu, rozmiaru lub znajdujące się w różnych fazach, co jest odwzorowane poprzez różne stany w modelu.

Ekspresja genów również może być modelowana przy pomocy PDMP. W modelu takim proces aktywacji i dezaktywacji genu jest modelowany jako losowa, skokowa zmiana stanu układu, a zmiany poziomów mRNA, białka i innych cząsteczek są opisywane poprzez równania różniczkowe. W najprostszym przypadku, gdy model stanowi jedno równanie opisujące poziom białka, poprzez procesy produkcji (na podstawie genu, którego stan może być aktywny lub nieaktywny) oraz degradacji. Ze względu na prostotę takiego modelu, możliwe jest wyznaczenie zarówno trajektorii układu w obu stanach oraz funkcji prawdopodobieństwa czasu przebywania układu w obu stanach [53].

Układy ze stochastycznymi przełączeniami mają również zastosowanie w innych systemach biologicznych, takich jak populacja neuronów o różnej aktywności czy populacja ludzka z podziałami ze względu na wiek. Różne zastosowania układów kawałkami deterministycznych w biologii oraz matematyczny opis takich układów został przedstawiony w monografii R. Rudnickiego oraz M. Tyran-Kamińskiej z 2017 roku [55].

Bazując na teoretycznych podstawach modelowania układów kawałkami deterministycznych, zaproponowałam algorytm pozwalający na symulacje układu ze stochastycznymi przełączeniami. Zaproponowany algorytm bazuje na modelach typu *flow with jumps*, łączy symulacje deterministyczne poziomów zmiennych ze stochastycznymi, skokowymi zmianami domen (skutkującymi zmianami parametrów). Do symulacji deterministycznych zmian poziomów białek i mRNA zaproponowałam wykorzystanie algorytmu Rungego-Kutty, natomiast czas przełączenia oraz kolejność podsystemów został opisana losowymi funkcjami, o charakterze funkcji Hilla. Zmiana wartości parametru Hilla w funkcji praw-

dopodobieństwa pozwala badać wpływ zwiększenia losowości aktywacji/dezaktywacji na przebiegi czasowe i zróżnicowanie odpowiedzi w otrzymanej populacji heterogenicznej.

Rozdział 3

Wybrana metodologia analizy układów z przełączeniami

Wraz ze wzrostem stopnia skomplikowania modelu matematycznego, zazwyczaj wzrasta trudność jego analizy. W przypadku złożonych, silnie nieliniowych modeli analityczne określenie zachowania układu jest najczęściej niemożliwe, a przebiegi czasowe otrzymuje się poprzez symulacje numeryczne. Natomiast dla układów liniowych można wyznaczyć np. rozwiązanie analityczne, w przeciwieństwie do układów silnie nieliniowych. W przypadku modeli kawałkami liniowych, dzięki podziałowi układu na funkcjonalne części, istnieją możliwości zastosowania różnych metod analizy, np. poprzez wyznaczenie rozwiązania analitycznego w poszczególnych domenach, stworzenie grafu tranzycji czy analityczne wyliczenie lokalizacji punktów stacjonarnych układu. W niniejszej pracy proponuję również autorskie metody modelowania oraz analizy układów uwzględniających heterogeniczność populacji. Pierwsza z metod umożliwia deterministyczne modelowanie zróżnicowanej populacji komórkowej, poprzez zastosowanie funkcji losowych do zróżnicowania lokalizacji wartości progowych w populacji. Druga zaproponowana metoda pozwala modelować zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej, poprzez stochastyczną aktywację procesów. Losowości aktywacji procesów skutkuje zróżnicowaniem poziomów białka w populacji, desynchronizacją oraz wpływa na czas aktywacji odpowiedzi komórkowej. Przeprowadzenie kompleksowej analizy modeli kawałkami liniowych umożliwia dokładniejsze poznanie właściwości układu i możliwości oddziaływania na niego.

Prawidłowo działające systemy biologiczne są w stanie homeostazy, czyli mają zdolność do utrzymywania stałych warunków środowiska i przeciwdziałania zewnętrznym wymuszeniom [27]. Homeostaza systemu biologicznego sprowadza się do stabilności układu, ponieważ oznacza, że układ po wyprowadzeniu ze stanu równowagi sam powraca do tego stanu. Niestabilne zachowanie sieci genowo-komórkowych najczęściej wiąże się z procesami chorobotwórczymi, nowotworowymi lub aktywacją apoptozy. Jednocześnie, pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego, występujące w układach biologicznych, mogą powodować powstawanie regularnych oscylacji, co świadczyłoby o znajdowaniu się układu na granicy stabilności. Możliwość zbadania stabilności danego układu oraz zakresu wartości wymuszeń, pozwalających na uzyskanie pożądanej dynamiki, jest bardzo pomocna przy badaniu funkcjonowania danego systemu biologicznego.

Analiza stabilności układów z przełączeniami nie jest zagadnieniem trywialnym, co potwierdza mnogość prac, które powstały w tym temacie (np. [56, 57] i referencje w nich).

Określenie stabilności podukładów nie jest wystarczające, aby jednoznacznie wnioskować o stabilności całego systemu. W systemie złożonym wyłącznie ze stabilnych podukładów, przełączenia pomiędzy nimi mogą skutkować destabilizacją całego systemu. Natomiast system złożony z niestabilnych podsystemów może stabilizować się poprzez odpowiednio dobrane przełączenia pomiędzy nimi [58, 59]. W związku z tym, zagadnienie analizy stabilności układów z przełączeniami jest zagadnieniem kompleksowym, uwzględniającym dynamikę podukładów, zasady przełączeń między podukładami oraz sygnał przełączający. Analiza układów z przełączeniami, ze szczególnym uwzględnieniem analizy stabilności, jest przedstawiona w dalszej części tego rozdziału.

3.1 Analityczne rozwiązanie modelu z przełączeniami

W przypadku układów z przełączeniami, w których podukłady są liniowe, znalezienie rozwiązania analitycznego dla każdego z podukładów jest zawsze możliwe. W celu znalezienia rozwiązania analitycznego dla całego układu, poza znajomością rozwiązań analitycznych dla wszystkich podukładów, konieczna jest również znajomość sygnału przełączającego, a dokładnie czasu przełączeń i sekwencji podukładów. W przypadku układów z przełączeniami zależnymi od czasu, sygnał przełączający jest znany, jednakże w przypadku układów z przełączeniami zależnymi od stanu układu, czasy oraz kolejność przełączeń pomiędzy podukładami często nie są łatwe do określenia.

Wyprowadzenie rozwiązania analitycznego dla układu kawałkami liniowego jest przedstawione w książce Z. Suna *Switched Linear Systems* [2]. Zgodnie z przyjętą tam notacją, układ kawałkami liniowy o ciągłym czasie jest opisany równaniem:

$$\frac{dx(t)}{dt} = A_\sigma x(t) + B_\sigma u(t), \tag{3.1}$$

gdzie x to wektor zmiennych stanu, A – macierz stanu, B – macierz wejścia, u – wejście, a σ to sygnał przełączający, warunki początkowe układu $x(t_0) = x_0$. Trajektoria stanu w czasie t jest oznaczona jako $\phi(t; t_0, x_0, u, \sigma)$. Przy założeniu że sygnał przełączający jest dobrze znany, sekwencje przełączającą można zapisać jako:

$$\{x_0, (t_0, i_0), (t_1, i_1), \ldots, (t_l, i_l)\}.$$

W czasie $[t_0, t_1)$ aktywny jest podukład i_0, dlatego układ w tym czasie jest opisany przez równanie różniczkowe:

$$\frac{dx(t)}{dt} = A_{i_0} x(t) + B_{i_0} u(t), \quad x(t_0) = x_0, \quad t \in [t_0, t_1). \tag{3.2}$$

Jako że powyższe równanie jest to liniowe równanie różniczkowe z podanym warunkiem początkowym, jego trajektoria w czasie t może być określona wprost jako:

$$\phi(t; t_0, x_0, u, \sigma) = e^{A_{i_0}(t-t_0)} x_0 + \int_{t_0}^{t} e^{A_{i_0}(t-\tau)} B_{i_0} u(\tau) d\tau \quad t \in [t_0, t_1), \tag{3.3}$$

a stan układu w czasie t_1 wynosi:

$$x(t_1) = e^{A_{i_0}(t_1-t_0)} x_0 + \int_{t_0}^{t_1} e^{A_{i_0}(t-\tau)} B_{i_0} u(\tau) d\tau. \tag{3.4}$$

Podobnie można wyznaczyć trajektorie i stanu układu w dowolnej chwili, konieczna jest tylko znajomość kolejności podukładów oraz czasów przełączeń. Rozwiązanie układu z przełączeniami może być obliczone na podstawie wzoru:

$$\begin{aligned}\phi(t;t_0,x_0,u,\sigma) &= e^{A_{i_k}(t-t_k)}e^{A_{i_{k-1}}(t_k-t_{k-1})}\dots e^{A_{i_1}(t_2-t_1)}e^{A_{i_0}(t_1-t_0)}x_0 \\ &+ e^{A_{i_k}(t-t_k)}\dots e^{A_{i_1}(t_2-t_1)}\int_{t_0}^{t_1} e^{A_{i_0}(t_1-\tau)}B_{i_0}u(\tau)d\tau \\ &+ \dots + e^{A_{i_k}(t-t_k)}\int_{t_{k-1}}^{t_k} e^{A_{i_{k-1}}(t_k-\tau)}B_{i_k}u(\tau)d\tau \\ &+ \int_{t_k}^{t} e^{A_{i_k}(t-\tau)}B_{i_k}u(\tau)d\tau \quad t\in[t_k,t_{k+1}). \end{aligned} \tag{3.5}$$

Niech

$$\psi(t,\sigma,x_0) = e^{A_{i_k}(t-t_k)}e^{A_{i_{k-1}}(t_k-t_{k-1})}\dots e^{A_{i_1}(t_2-t_1)}e^{A_{i_0}(t_1-t_0)} \quad t\in[t_k,t_{k+1}). \tag{3.6}$$

Macierz przejścia (ang. *state transition matrix*) w czasie $[t_1,t_2)$ może być zapisana jako:

$$\Phi(t_1,t_2,\sigma,x_0) = \psi(t_1,\sigma,x_0)(\psi(t_2,\sigma,x_0))^{-1} \tag{3.7}$$

Rozwiązanie całego układu jest zapisane przy wykorzystaniu macierzy przejścia jako:

$$\phi(t;t_0,x_0,u,\sigma) = \Phi(t,t_0,\sigma,x_0)x_0 + \int_{t_0}^{t}\Phi(t,\tau,\sigma,x_0)u(\tau)d\tau. \tag{3.8}$$

Jeśli w układzie kawałkami liniowym sygnał przełączający jest w pełni zdefiniowany i wejście jest globalnie całkowalne, to zawsze jest możliwe wyznaczenie rozwiązania dla kolejnych chwil czasu. Nawet jeśli wejście do układu jest ciągłe — zazwyczaj rozwiązanie analityczne w chwilach przełączenia nie jest ciągłe: funkcja je opisująca lub jej pochodna nie jest funkcją ciągłą (nie należy do klasy C^1). Macierz tranzycji zawiera wielokrotne mnożenie macierzy funkcji w formie e^{At}, co pełni ważną rolę w analizie liniowych układów z przełączeniami [2].

W układach o określonych czasach przełączenia oraz sekwencji podukładów wyznaczenie rozwiązania analitycznego dla pełnego systemu jest możliwe. Jednakże w przypadku systemu z przełączeniami zależnymi od stanu układu, wyznaczenie czasu przełączenia jest praktycznie możliwe tylko w prostych układach. Wraz ze wzrostem stopnia skomplikowania modelu w danym podukładzie wzrasta trudność wyznaczenia czasu przełączenia, a w niektórych przypadkach staje się to niemożliwe do wykonania. Dla podanego wcześniej prostego modelu produkcji białka zależnego od czynnika transkrypcyjnego (równania (2.17 –2.18)) można wyznaczyć rozwiązanie analityczne, które w domenie poniżej wartości progowej będzie miało postać:

$$Y(t) = \frac{p_1}{d_1} + \Big(Y_0 - \frac{p_1}{d_1}\Big)e^{-d_1 t}, \tag{3.9}$$

$$X(t) = X_0 e^{-d_2 t}, \tag{3.10}$$

natomiast w domenie powyżej wartości progowej równianie opisujące poziom białka Y jest takie samo, a równanie opisujące poziom X jest następujące:

$$X(t) = \frac{p_2}{d_2} + \Big(X_0 - \frac{p_2}{d_2}\Big)e^{-d_2 t}. \tag{3.11}$$

W niniejszym układzie wartość progowa istnieje tylko dla białka Y, więc czas przełączenia, czyli osiągnięcia wartości progowej (θ), wyliczony z równania (3.9), jest równy:

$$\theta = \frac{p_1}{d_1} + \Big(Y_0 - \frac{p_1}{d_1}\Big)e^{-d_1 t_s}, \tag{3.12}$$

$$t_s = \frac{1}{d_1} ln\Big(\frac{Y_0 d_1 - p_1}{\theta d_1 - p_1}\Big), \tag{3.13}$$

przy założeniach $Y_0 \neq p_1/d_1$ oraz $\theta \neq p_1/d_1$. Wartość czasu przełączenia może być dodatnia lub ujemna, w zależności od wartości parametrów oraz punktu początkowego. Jeśli wyliczona wartość czasu przełączenia jest dodatnia, to układ, startując z punktu początkowego Y_0, zmierza w stronę wartości progowej, a w czasie t_s nastąpi przejście do drugiej domeny. Natomiast, jeśli wartość jest ujemna, to trajektoria startująca z danego punktu, nie natrafi na wartość progową i nie nastąpi zmiana domeny.

Dla wartości podanych w Tabeli 2.1, czas przełączenia w układzie startującym z podukładu poniżej wartości progowej będzie dodatni, natomiast dla warunków początkowych w podukładzie powyżej wartości progowej, trajektorie będą zmierzały do punktu stacjonarnego i nie przejdą przez wartość graniczną. Niemniej jednak, dla wybranych warunków początkowych ($Y_0 < \theta, X_0$), w niniejszym układzie można wyznaczyć pełne rozwiązanie analityczne. Dla zmiennej Y jest ono ciągłe i nie zawiera przełączenia, dlatego jest zgodne z równaniem (3.9). Dla białka X rozwiązanie w czasie $t < t_s$ jest opisane równaniem (3.10), a w czasie $t > t_s$ jest następujące:

$$X(t) = \frac{p_2}{d_2} + \Big(X_0 e^{-d_2(t_s - t_0)} - \frac{p_2}{d_2}\Big)e^{-d_2(t - t_s)}, \tag{3.14}$$

gdzie t_s to czas przełączenia podany równaniem (3.13).

Dla bardziej skomplikowanych równań, zadanie znalezienia czasu przełączenia często jest niewykonalne analitycznie. W układach, w których wyliczenie czasu przełączenia jest możliwe, sekwencja przełączeń, a w efekcie rozwiązanie analityczne jest określone tylko dla zadanych warunków początkowych. Z tych powodów stworzenie kompletnego, analitycznego opisu układu z przełączeniami, w przeważającej liczbie przypadków, nie jest możliwe. Niemniej jednak, sam fakt rozwiązania analitycznego modeli w poszczególnych podukładach wnosi wiele informacji na temat analizowanego układu. Na podstawie rozwiązania analitycznego można łatwo wyliczyć punkty równowagi w poszczególnych podukładach. Ponadto zamiast rozwiązania numerycznego, można je wykorzystać do określenia przebiegów czasowych dla zadanych warunków początkowych.

3.2 Zastosowanie grafu tranzycji do analizy układów z przełączeniami

Grafy tranzycji, nazywane również grafami przejścia, są wykorzystywane do przedstawienia w sposób schematyczny dekompozycji procesu na operacje wykonywane w kolejnych etapach [60]. W układach z przełączeniami wykorzystuje się je do przedstawienia przejść pomiędzy podukładami [61, 44, 62]. Grafy stosuje się głównie w układach z przełączeniami zależnymi od stanu układu, ponieważ pozwalają na graficzne przedstawić podział przestrzeni stanu na podsystemy oraz oznaczyć kierunek przejścia trajektorii pomiędzy nimi. Graf tranzycji jest zbudowany z węzłów – odpowiadających podukładom oraz krawędzi (łuków, strzałek) określających kierunek przejścia. W literaturze opisującej grafy, podukłady

są często określane jako domeny lub regiony. Domeny oznaczone są wektorami wartości opisujących stosunek zmiennych do ich wartości progowych. Na przykład w układzie z dwiema wartościami progowymi dla jednej zmiennej, domeny będą oznaczone jako:

- $\{0\}$ – poniżej obu wartości progowych,
- $\{1\}$ – pomiędzy wartościami progowymi,
- $\{2\}$ – powyżej drugiej wartości progowej.

Wektor taki charakteryzuje daną domenę i pozwala zlokalizować ją w przestrzeni stanu. W celu stworzenia grafu tranzycji dla danego układu, należy wyliczyć punkty docelowe we wszystkich domenach. Punkt docelowy (określany w literaturze anglojęzycznej jako *focal point*) w danej domenie, to punkt, do którego dążą wszystkie trajektorie z danej domeny. Wyliczenie jego lokalizacji jest możliwe poprzez zastosowanie warunku na stan równowagi ($dx_i/dt = 0$). Punkt docelowy dla podstawowego równania (2.4) w domenie i jest równy:

$$\Phi_i = \frac{p_i}{d_i}. \tag{3.15}$$

Na podstawie lokalizacji punktu docelowego w przestrzeni stanu można określić kierunek, w jakim będą zmierzały trajektorie startujące z danej domeny. Informację tę należy przenieść na graf w postaci strzałek [62]. Dla prostego modelu z dwiema zmiennymi, z których każda ma jedną wartość progową, graf może mieć np. jedną z form przedstawionych na Rysunku 3.1. Aby wyróżnić oznaczenie domen od zwykłych wektorów, w niniejszej pracy zastosowałam nawiasy klamrowe, w których kolejne wartości opisują wartości kolejnych zmiennych względem ich wartości progowych, zatem $\{00\}$ oznacza, że zarówno pierwsza, jak i druga zmienna znajdują się poniżej swoich wartości progowych. Grafy tworzy się przy założeniu, że trajektoria nie może przejść przez dwie granice jednocześnie. Jeśli dla domeny $\{00\}$ punkt stacjonarny jest zlokalizowany w domenie $\{11\}$, strzałki będą skierowane z domeny $\{00\}$ do domeny $\{10\}$ oraz $\{01\}$ (Rysunek 3.1A). Na schemacie widoczne jest, że krawędzie z sąsiednich domen zmierzają do domeny 11, co informuje o występowaniu punktu stacjonarnego w tej domenie. Natomiast na Rysunku 3.1B łuki przechodzą sekwencyjne pomiędzy domenami $\{00\} \mapsto \{01\} \mapsto \{11\} \mapsto \{10\} \mapsto \{00\}$. Zamknięte sekwencje pomiędzy domenami występujące w grafach, informują o możliwości istnienia cyklu granicznego w układzie. Jednakże jest to warunek konieczny, ale nie wystarczający. W bardziej skomplikowanych systemach krążenie trajektorii pomiędzy domenami, może być przerwane poprzez natrafienie na wartość progową, która wymusi przejście do innej domeny, posiadającej punkt stacjonarny poza sekwencją. Przykład takiego zachowania zostanie omówiony później, na przykładzie modelu białka p53 w rozdziale 5.

3.3 Analiza punktów stacjonarnych w układach kawałkami liniowych

W układach kawałkami liniowych (PLDE) mogą występować dwa typy punktów stacjonarnych:

- zwyczajne (RSP – *regular stationary point*), które znajdują się wewnątrz domeny;

- osobliwe (SSP – *singular stationary point*), które są zlokalizowane na granicach pomiędzy domenami.

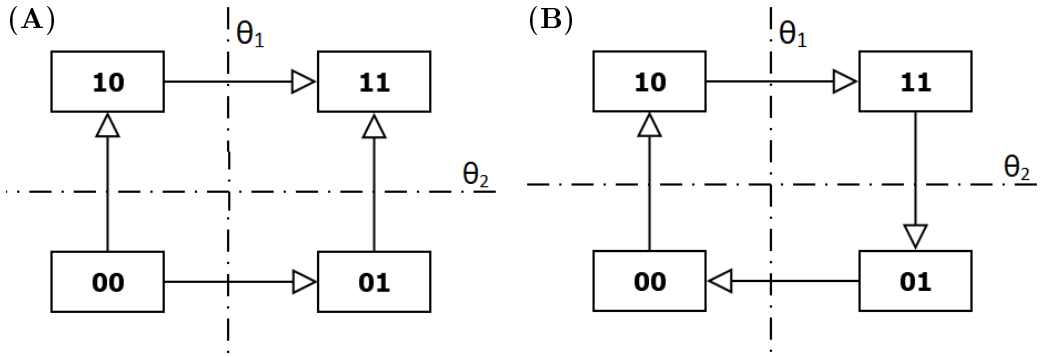
Lokalizacja osobliwych punktów stacjonarnych na wartościach progowych nie jest wynikiem szczególnego doboru parametrów, skutkującego lokalizacją punktu docelowego dokładnie w miejscu przełączenia podukładów, ale wynika z interakcji pomiędzy domenami. Osobliwy punkt stacjonarny może stanowić ognisko, wokół którego trajektorie układu krążą, ale nie zbliżają się do niego [17].

3.3.1 Zwyczajne punkty stacjonarne

Ze względu na liniowość równań różniczkowych, w każdym podukładzie może występować dokładnie jeden punkt stacjonarny RSP. W celu wyznaczenia punktów RSP występujących w układzie, należy dla każdego podukładu wyliczyć lokalizację punktów docelowych. Gdy punkt docelowy znajduje się w granicach podukładu, dla którego został wyliczony, to jest on asymptotycznie stabilnym punktem RSP. Należy jednak zauważyć, że basen przyciągania punktu RSP niekoniecznie musi pokrywać się z całą przestrzenią podukładu, dlatego też nie zawsze wszystkie trajektorie z danej domeny zmierzają do występującego w niej punktu RSP. Natomiast w przypadku, gdy punkt docelowy znajduje się poza granicami podukładu, wiadome jest, że trajektorie będą zmierzały do granicy, gdzie nastąpi przełączenie aktywnego podukładu.

3.3.2 Rodzaje ścian

W celu określenia zachowania układu w momencie przejścia przez granicę między domenami przydatne jest policzenie pochodnych układu po zmiennych przełączających Z_{ij}, zgodnie z metodologią zaproponowaną przez T. Mestla i in. w pracy [17]. W podstawowej definicji modelu kawałkami liniowego zmienne przełączające mają charakter binarny, a ich wartość zmienia się w momencie przejścia przez granicę. Aby umożliwić policzenie pochodnej po zmiennej przełączającej, wprowadza się założenie, że zmienna ta w zakresie różniczkowania, czyli w bliskim otoczeniu wartości granicznej θ_{ij}, jest opisywana przez liniową, ciągłą, monotoniczną funkcję, zawierającą się w zakresie [0,1]. Funkcja ta, zgodnie z nomenklaturą zaproponowaną w [17], jest nazywana logoidą. Wartości logoidy są zależne od wartości



Rysunek 3.1: Graf tranzycji między domenami dla prostego układu; (A) Trajektorie zmierzają do domeny {11}; (B) Trajektorie krążą między domenami (przerywane linie – wartości graniczne θ_1 oraz θ_2)

zmiennej x_i, jej wartości progowej θ_{ij} oraz odległości od wartości progowej δ. Zmienna rosnąca Z_{ij}^+ przyjmuje wartości:

$$Z_{ij}^+ = \begin{cases} 0 & \text{dla } x_i < \theta_{ij} - \delta, \\ \frac{1}{2\delta} x_i - \frac{1}{2\delta}(\theta_{ij} - \delta) & \text{dla } x_i \in (\theta_{ij} - \delta, \theta_{ij} + \delta), \\ 1 & \text{dla } x_i > \theta_{ij} + \delta, \end{cases} \tag{3.16}$$

natomiast zmienna malejąca Z_{ij}^+ przyjmuje wartości

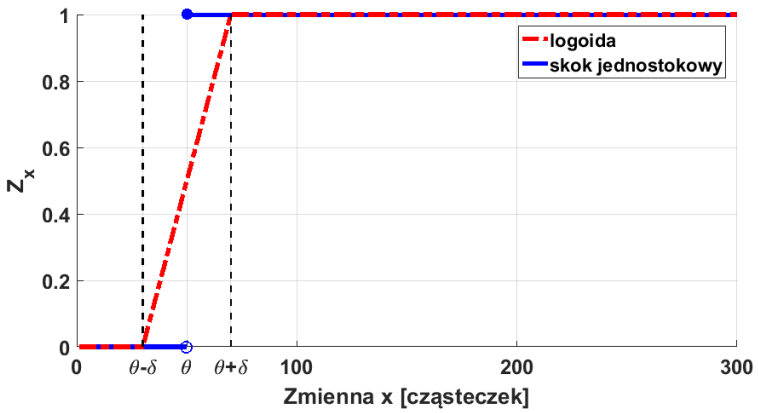
$$Z_{ij}^- = \begin{cases} 1 & \text{dla } x_i < \theta_{ij} - \delta, \\ -\frac{1}{2\delta} x_i + \frac{1}{2\delta}(\theta_{ij} + \delta) & \text{dla } x_i \in (\theta_{ij} - \delta, \theta_{ij} + \delta), \\ 0 & \text{dla } x_i > \theta_{ij} + \delta. \end{cases} \tag{3.17}$$

Aby uprościć zapis, można założyć, że wszystkie zmienne Z_{ij} używane w modelu są rosnące, a zmienne malejące są zapisywane jako

$$Z_{ij}^- = 1 - Z_{ij}^+. \tag{3.18}$$

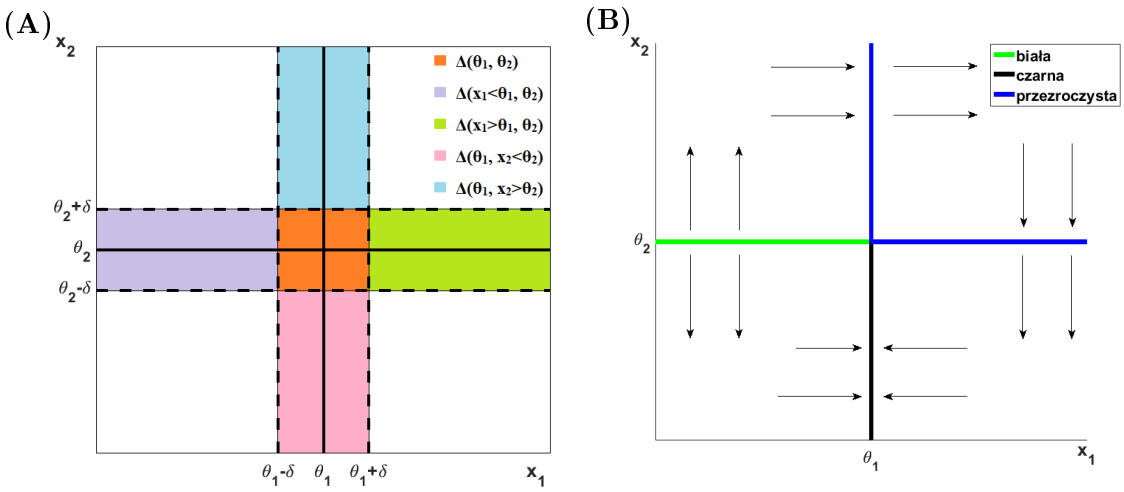
Ta notacja jest wykorzystywana w dalszej części pracy. Dla δ zmierzającego do zera, logoida zbliża się do funkcji skokowej. Porównanie funkcji skokowej i logoidy zostało przedstawione na Rysunku 3.2.

Dzięki zastąpieniu funkcji skokowych poprzez logoidy powstaje ciągłe przybliżenie modelu z przełączeniami. Model ten jest kawałkami liniowy wewnątrz domen, a w bliskim otoczeniu granic jest silnie nieliniowy. Nieliniowość ta wynika z mnożenia zmiennej przełączającej Z_{ij}, która w tym regionie jest rosnąca, przez zmienną stanu, a iloczyn dwóch zmiennych liniowych jest funkcją nieliniową. Nieliniowe przestrzenie układu w bliskiej okolicy granic są oznaczane jako Δ-regiony. Δ - regiony można podzielić ze względu na liczbę zmiennych leżących w pobliżu swoich wartości progowych (czyli w przestrzeni δ). Zmienne te, nazywane są w literaturze anglojęzycznej *primary*, w dalszej części rozprawy są nazywane zmiennymi pierwszorzędowymi (p), ponieważ są źródłem nieliniowej zmienności w układzie. Natomiast pozostałe zmienne przełączające mają stałą wartość w danym regionie, przez co nazywane są zmiennymi drugorzędowymi (ang. *secondary*). Liczba zmiennych pierwszorzędowych określa wymiarowość danego Δ-regionu.



Rysunek 3.2: Porównanie logoidy i funkcji skokowej

Liczba Δ-regionów oraz ich wymiar zależy od złożoności układu, liczby zmiennych oraz liczby wartości progowych. Przykładowo w układzie z dwiema zmiennymi stanu, które mają po jednej wartości progowej istnieje jeden Δ-region drugiego wymiaru ($\Delta(\theta_1, \theta_2)$) oraz 4 Δ-regiony pierwszego wymiaru. W opisie Δ-regionów zmienne pierwszorzędowe oznacza się poprzez nazwy progów, na których leżą, a zmienne drugorzędowe poprzez oznaczenie ich wartości względem wartości progowej. Na przykład Δ-region pierwszego wymiaru oznaczony jako $\Delta(\theta_1, x_2 < \theta_2)$ to region znajdujący się w pobliżu wartości progowej θ_1 dla zmiennej x_2 mniejszej od wartości progowej θ_2 (Rysunek 3.3A - różowy kolor).



Rysunek 3.3: Przestrzeń stanu układu z wartościami progowym θ_1 i θ_2; (A) Δ-regiony występujące w układzie: jeden region dwuwymiarowy ($\Delta(\theta_1, \theta_2)$) oraz 4 regiony jednowymiarowe ($\Delta(x_1 < \theta_1, \theta_2)$, $\Delta(x_1 > \theta_1, \theta_2)$, $\Delta(\theta_1, x_2 < \theta_2)$, $\Delta(\theta_1, x_2 > \theta_2)$); (B) Typy ścian występujące w układzie

W Δ-regionach jednowymiarowych analizowane jest przejście pomiędzy dwoma sąsiednimi regionami, rozdzielonymi jedną wartością progową. Regiony takie nazywane są ścianami, a w zależności od zachowania się układu w ich pobliżu, można je podzielić na ściany białe, czarne i przezroczyste. Rodzaj ściany jest określony na podstawie zachowania trajektorii w jej bliskiej okolicy (Rysunek 3.3B):

- biała ściana – trajektorie po obu stronach granicy uciekają od ściany;
- czarna ściana – trajektorie z obu stron zbiegają się do ściany;
- przezroczysta ściana – trajektorie z jednej strony zbiegają się do ściany, a z drugiej uciekają.

Typy ścian są ściśle powiązane z możliwością występowania na nich osobliwych punktów stacjonarnych. Metoda, zaproponowana przez T. Mestla i in. [17, 62, 63], pozwala na określenie rodzaju ściany oraz występowania na niej punktów SSP. W celu określenia rodzaju ściany dla danej wartości progowej θ_{ij} należy wyliczyć wartość pochodnej $\partial F_i / \partial Z_{ij}$, gdzie F_i to pochodna czasowa opisująca zmiany poziomu danej zmiennej w domenie ($F_i = dx_i/dt$), a Z_{ij} to zmienna przełączająca.

W przykładowym układzie pokazanym na Rysunku 3.3B występują dwie zmienne (x_1 i x_2), a każda z nich zawiera jedną wartość progową (odpowiednio θ_1 i θ_2). W układzie

tym istnieją wszystkie trzy rodzaje ścian: białe (zielony), czarne (czarny) i przezroczyste (niebieski). Zachowanie układu znajdującego się w pobliżu wartości progowych jest przedstawione strzałkami, które pokazują kierunki pola trajektorii w okolicy granic.

Białe ściany

Granica między podukładami jest nazywana białą ścianą, jeśli zwroty trajektorii z obu sąsiadujących domen są skierowane przeciwnie do danej granicy. Warunkiem występowania białej ściany jest dodatnia wartość pochodnej:

$$\frac{\partial F_i}{\partial Z_{ij}} > 0. \tag{3.19}$$

Punkty znajdujące się na białej ścianie są niestabilne. Przy założeniu $\theta_1 < p_1/d_1$ przykładowy układ, w którym występuje biała ściana jest opisany równaniem:

$$F_1 = \frac{dx_1}{dt} = p_1 Z_1 - d_1 x_1 \tag{3.20}$$

$$domena\,\{0\} : \frac{dx_1}{dt} = -d_1 x_1 \tag{3.21}$$

$$domena\,\{1\} : \frac{dx_1}{dt} = p_1 - d_1 x_1 \tag{3.22}$$

$$\frac{\partial F_1}{\partial Z_1} = p_1. \tag{3.23}$$

W układzie wszystkie trajektorie oddalają od wartości progowej.

Czarne ściany

Gdy trajektorie obu sąsiadujących domen są skierowane do granicy, nazywana jest ona czarną ścianą. W takim przypadku pochodna ma wartość ujemną:

$$\frac{\partial F_i}{\partial Z_{ij}} < 0. \tag{3.24}$$

Na czarnej ścianie znajduje się punkt stacjonarny SSP. Przy założeniu $\theta_1 < p_1/d_1$ przykładowy układ zawierający czarną ścianę może mieć następującą formę:

$$F_1 = \frac{dx_1}{dt} = p_1(1 - Z_1) - d_1 x_1 \tag{3.25}$$

$$domena\,\{0\} : \frac{dx_1}{dt} = p_1 - d_1 x_1 \tag{3.26}$$

$$domena\,\{1\} : \frac{dx_1}{dt} = -d_1 x_1 \tag{3.27}$$

$$\frac{\partial F_1}{\partial Z_1} = -p_1. \tag{3.28}$$

Wszystkie trajektorie w powyższym układzie zbliżają się do punktu zlokalizowanego na wartości progowej. W efekcie w układzie może występować poślizg na granicy.

Przezroczyste ściany

Ściana przezroczysta jest to granica, rozdzielająca domeny, z których jedna posiada trajektorie skierowane do granicy, natomiast druga w kierunku przeciwnym do granicy. Ściany przezroczyste występują w układzie, jeśli dana zmienna nie jest zależna od swojej wartości progowej. W takim przypadku, przy przejściu przez granicę, nie zmienia się równanie opisujące zmiany poziomu danej zmiennej, a pochodna jest równa zeru:

$$\frac{\partial F_i}{\partial Z_{ij}} = 0. \tag{3.29}$$

Przekroczenie danej wartości progowej powoduje zmianę zachowania układu, poprzez zmianę modelu innych zmiennych. Przykładem modelu, w którym występują przezroczyste ściany, jest model (równania (2.7) – (2.8)), gdzie zmienna x_1 zależy od wartości progowej θ_2, a zmienna x_2 zależy od θ_1.

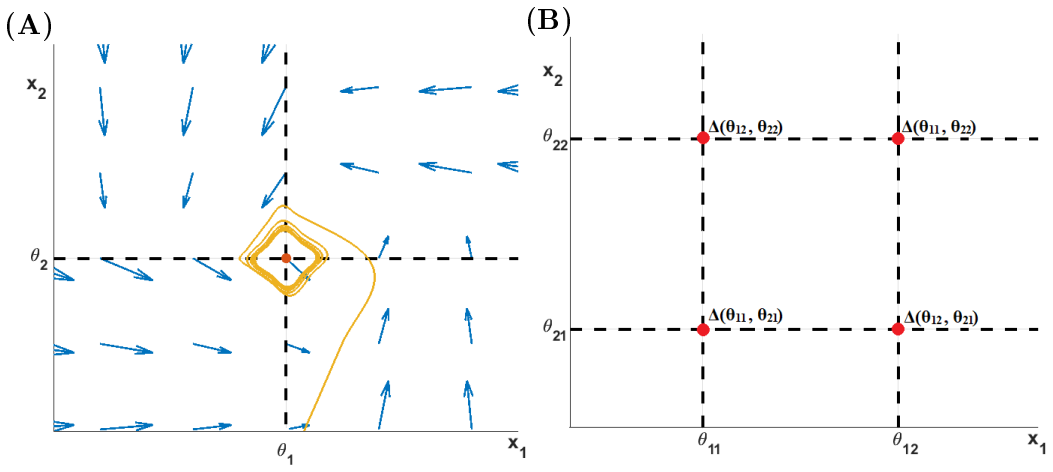
3.3.3 Osobliwe punkty stacjonarne

Osobliwe punkty stacjonarne (SSP) są zlokalizowane w Δ-regionach pomiędzy domenami i analogicznie do Δ-regionów, określa się ich wymiarowość. Punkt SSP może występować w Δ-regionie o wymiarze 1, jeśli jest to czarna ściana. Przykładem modelu układu biologicznego, w którym występuje taka zależność jest model produkcji białka, w którym białko bezpośrednio aktywuje proces swojej degradacji lub dezaktywacji swojego genu (np. model opisany równaniem (3.25)). W układzie zawierającym punkt SSP pierwszego wymiaru występuje poślizg na granicy [11, 12]. Trajektorie po zderzeniu z granicą nie mogą jej opuścić i występuje poślizg na powierzchni granicy w stronę punktu równowagi [64, 65]. Jednakże, w rzeczywistym układzie regulacja procesów jest bardziej skomplikowana, ponieważ może zawierać etapy pośrednie i/lub opóźnienia. Z tego względu, zamiast ściśle poślizgowego charakteru odpowiedzi układu, obserwuje się oscylacje.

W systemach posiadających kilka wartości progowych, mogą występować punkty SSP drugiego i wyższych wymiarów, w zależności od wymiaru Δ-regionu, w którym się znajdują. Punkty SSP drugiego i wyższych wymiarów są zlokalizowane na przecięciu obszarów wokół przezroczystych ścian. Trajektorie układu, przechodzą przez granicę i kontynuują swój przebieg w kolejnej domenie, dlatego w takim układzie często występują stabilne oscylacje. Na Rysunku 3.4A przestawiony jest przykładowy cykl graniczny wokół osobliwego punktu stacjonarnego typu centrum, zlokalizowanego na przecięciu przezroczystych ścian. Algorytm wyznaczania osobliwych punktów stacjonarnych, ich lokalizacji oraz stabilności jest przedstawiony w kolejnych podrozdziałach.

Wydzielenie Δ-regionów

Załóżmy, że mamy układ produkcji białka opisany równaniami różniczkowymi czasowymi $F_i = dx_i/dt$ dla $n = 1, \ldots, n$, gdzie n to liczba zmiennych w układzie. W układzie występują wartości progowe, przez co model zawiera zmienne przełączające Z_{ij}. Wektor zmiennych przełączających Z_{ij} jest oznaczony jako $\mathbf{Z}$. W przypadku, gdy każda zmienna ma po jednej wartości progowej, można stworzyć wektor $\mathbf{Z} = [Z_1, Z_2, \ldots, Z_n]$, który jest pomocny przy badanu stanu układu na przecięciu wartości progowych $[\theta_1, \theta_2, \ldots, \theta_n]$. Jeśli w układzie występuje kilka wartości progowych dla jednej zmiennej stanu, konieczne jest rozpatrywanie zachowania układu we wszystkich możliwych przecięciach wartości granicznych, co



Rysunek 3.4: (A) Przestrzeń stanu z cyklem i punktem stacjonarnym zlokalizowanym na przecięciu wartości progowych. Żółta linia prezentuje przykładową trajektorię dla wybranych warunków początkowych; (B) Przestrzeń stanu układu dwóch zmiennych z dwiema wartościami progowymi

znacząco zwiększa ilość obliczeń. Na Rysunku 3.4B przedstawiona jest przestrzeń stanu układu dwóch zmiennych, z których każda ma dwie wartości progowe. W układzie występują cztery Δ-regiony 2-wymiaru (oznaczone kropkami), które można scharakteryzować poprzez wyznaczenie czterech wektorów zmiennych przełączających:

- $\Delta(\theta_{11}, \theta_{21})$ – wektor $\mathbf{Z_{11}} = [Z_{11}, Z_{21}]$,
- $\Delta(\theta_{12}, \theta_{21})$ – wektor $\mathbf{Z_{21}} = [Z_{12}, Z_{21}]$,
- $\Delta(\theta_{11}, \theta_{22})$ – wektor $\mathbf{Z_{12}} = [Z_{11}, Z_{22}]$,
- $\Delta(\theta_{12}, \theta_{22})$ – wektor $\mathbf{Z_{22}} = [Z_{12}, Z_{22}]$.

Aby ograniczyć liczbę Δ-regionów, w których sprawdzane jest występowanie punktów SSP, można wykonać wstępną analizę ich właściwości. W tym celu w pracy T. Mestla i in. [17] proponowana jest metoda, która bada zachowanie układu w bliskiej okolicy wartości progowych. Metoda ta jest skuteczna tylko w układach zawierających wyłącznie procesy produkcji i degradacji. Jeśli w układzie występują dodatkowo procesy powodujące bezpośrednią zależność jednej zmiennej od drugiej, takie jak transport czy produkcja białka na podstawie mRNA, wynik analizy regionu może być fałszywie ujemny. W przypadku bardziej skomplikowanych układów przedstawiam własną metodę, która pozwala w sposób szacunkowy określić możliwość występowania punktu SSP. Zastosowanie tych metod wyboru regionów do dalszej analizy pozwala bardzo skrócić analizę, ponieważ pozwala na wyeliminiowanie wielu regionów, w których nie występują punkty SSP.

Układy proste (produkcja, degradacja): W prostych układach kawałkami liniowych zakłada się, że dana zmienna jest zależna tylko od procesu produkcji (wyraz wolny) oraz degradacji (zależny od poziomu zmiennej), przy czym oba procesy mogą być opisane parametrami zależnymi od wszystkich zmiennych przełączających występujących w układzie. Nie ma natomiast bezpośredniej zależności jednej zmiennej od innej zmiennej stanu. Pierwszym

krokiem algorytmu [17] jest stworzenie macierzy logoid-Jacobiego $\mathbf{L}$ poprzez zróżniczkowanie pochodnych czasowych F_i po kolejnych zmiennych przełączających $\mathbf{Z}$. Ze względu na zastosowanie logoid do opisu wartości zmiennych przełączających, są one ciągłe w zakresie różniczkowania, a powstała macierz Jacobiego jest nazywana macierzą logoid-Jacobiego:

$$\mathbf{L} = \frac{\partial \mathbf{F}}{\partial \mathbf{Z}} = \begin{bmatrix} \frac{\partial F_1}{\partial Z_1}, & \cdots, & \frac{\partial F_1}{\partial Z_i} \\ \vdots, & \ddots, & \vdots \\ \frac{\partial F_i}{\partial Z_1}, & \cdots, & \frac{\partial F_i}{\partial Z_i} \end{bmatrix}. \tag{3.30}$$

Macierz główna logoid-Jakobiego $\mathbf{L}$ ma wymiar $n \times n$, wiersze macierzy odpowiadają kolejnym zmiennym stanu x_i, a kolumny kolejnym zmiennym przełączającym Z_{ij}. Macierz główna charakteryzuje układ w Δ-regionie n-wymiarowym, na przecięciu wszystkich wartości progowych, natomiast podmacierze macierzy głównej charakteryzują regiony o mniejszych wymiarowościach (na przecięciu kilku wartości progowych lub na ścianach między domenami). Dany Δ-region o wymiarze k jest charakteryzowany przez podmacierz logoid-Jacobiego o wymiarze $k \times k$. Jeśli wyznacznik danej macierzy logoid-Jacobiego jest równy 0, to w danym Δ-regionie nie występuje punkt SSP w granicy $\delta \to 0$ (gdzie δ jest parametrem w równaniu (3.16)). Zatem w celu określenia Δ-regionów, w których mogą występować punkty SSP, należy znaleźć Δ-regiony o niezerowych logoid-jakobianach. Regiony te należy następnie przeanalizować w celu wyznaczenia dokładnej lokalizacji punktu SSP i jego właściwości.

Układy złożone (produkcja, degradacja, transport, i in.): W układach złożonych zakładamy, że zmienne stanu mogą być zależne od zmiennych przełączających, a także bezpośrednio od innych zmiennych stanu. Pozwala to na modelowanie różnych procesów, takich jak transport z jednej przestrzeni do drugiej (np. białko cytoplazmatyczne jest transportowane do jądra), aktywacja (np. białko nieaktywne zostaje ufosforylowane, i staje się aktywne), produkcja białka na podstawie mRNA (liczba cząsteczek mRNA przekłada się na tempo produkcji białka). Metoda proponowana w pracy [17] nie pozwala na uwzględnienie takich zależności, dlatego zaproponowałam metodę pozwalającą na wyznaczenie Δ-regionów, w których mogą występować punkty SSP, również w bardziej skomplikowanych układach. Zaproponowaną metodę przedstawię na następującym układzie:

$$\frac{dx_1(t)}{dt} = p_1 - d_1 x_1(t) - d_{13} Z_3 x_1(t), \tag{3.31}$$

$$\frac{dx_2(t)}{dt} = p_2 + p_{21} x_1 - d_2 x_2(t), \tag{3.32}$$

$$\frac{dx_3(t)}{dt} = p_3 + p_{32} Z_2 - d_3 x_3(t). \tag{3.33}$$

Pierwszym krokiem jest wyznaczenie macierzy Jacobiego ($\mathbf{J}$) oraz logoid-Jacobiego ($\mathbf{L}$) dla analizowanego układu:

$$\mathbf{J} = \frac{\partial \mathbf{F}}{\partial \mathbf{x}} = \begin{bmatrix} -d_1 - d_{13} Z_3 & 0 & 0 \\ p_{21} & -d_2 & 0 \\ 0 & 0 & -d_3 \end{bmatrix}, \tag{3.34}$$

oraz

$$\mathbf{L} = \frac{\partial \mathbf{F}}{\partial \mathbf{Z}} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & -d_{13} x_1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & p_{32} & 0 \end{bmatrix}. \tag{3.35}$$

Macierz Jacobiego zawiera informacje o bezpośrednich zależnościach między zmiennymi stanu w układzie, a macierz logoid-Jacobiego zawiera informacje o zależnościach między zmiennymi stanu poprzez zmienne przełączające. Następnie należy przygotować schematyczne macierze oznaczając w nich niezerowe elementy wraz ze znakiem.

$$\mathbf{J_s} = \begin{bmatrix} -j_{11}, & 0 & 0 \\ j_{21} & -j_{22} & 0 \\ 0 & 0 & -j_{33} \end{bmatrix}, \tag{3.36}$$

oraz

$$\mathbf{L_s} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & -l_{13} \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & l_{32} & 0 \end{bmatrix}, \tag{3.37}$$

Tak powstałe macierze należy nałożyć na siebie i stworzyć jedną, zbiorczą macierz uwzględniającą zarówno oddziaływania bezpośrednie, jak i pośrednie:

$$\mathbf{JL} = \begin{bmatrix} -j_{11} & 0 & -l_{13} \\ j_{21} & -j_{22} & 0 \\ 0 & l_{32} & -j_{33} \end{bmatrix}. \tag{3.38}$$

W dalszej analizie, uwzględnia się wyłącznie istnienie oddziaływania oraz jego znak, a nie konkretne wartości. Jeśli dany element jest niezerowy zarówno w macierzy $\mathbf{J_s}$, jak i $\mathbf{L_s}$, to element w macierzy zbiorczej należy zapisać obydwa elementy jako sumę. Dzięki temu informacja o oddziaływaniach pomiędzy zmiennymi nie zostanie pominięta. Następnie należy przeprowadzić analizę w kierunku znalezienia zamkniętych sekwencji zmiennych, które są zależne od siebie. Wiersze macierzy **JL** oznaczają zmienną, na którą się wpływa, a kolumny – zmienna wpływającą. Analizując powyższą macierz **JL** widać, że zmienna x_1 (1. kolumna) wpływa na zmienne x_1 i x_2 (1. i 2. wiersz są niezerowe). Szukając sekwencji zamkniętych możemy zauważyć, że zmienna x1 wpływa na zmienną x_2 poprzez dodatnią zmienną przełączającą (l_{21}), z kolei zmienna x_2 wpływa bezpośrednio, dodatnio na x_3 (j_{32}), a x_3 wpływa ujemnie na zmienną x_1 poprzez zmienną przełączającą ($-l_{31}$). Występująca sekwencja ma postać: $x_1 \rightarrow x_2 \rightarrow x_3 \rightarrow x_1$. Ponadto jeden z elementów jest ujemny a dwa dodatnie, zatem w sekwencja ta opisuje sprzężenie ujemne i może być powiązana z występowaniem punktu SSP. Na podstawie sekwencji można wyznaczyć regiony, w których może występować punkt SSP. Wyznaczona sekwencja zawiera zależność zmiennych modelu od dwóch zmiennych przełączających (Z_1 i Z_3), dlatego Δ-regiony, w których może występować SSP, są zlokalizowane na przecięciu wartości progowych θ_1 i θ_3. Są to dwa Δ-region: jeden na przecięciu dwóch wartości progowych $(\theta_1, x_2, \theta_3)$ i drugi na przecięciu trzech wartości progowych Δ-region $(\theta_1, \theta_2, \theta_3)$. Regiony te należy poddać dalszej analizie w kierunku występowania punktu SSP.

Wyznaczenie dokładnej lokalizacji SSP

Stwórzmy dwa wektory: jeden, zawierający indeksy zmiennych pierwszorzędowych w danym Δ-regionie – p, oraz drugi, zawierający indeksy zmiennych drugorzędowych – s. W danym Δ-regionie pierwszorzędowe zmienne stanu (x_p) w granicy $\delta \rightarrow 0$ są równe wartościom progowym θ_p, a ich zmienne przełączające $\mathbf{Z_p}$ zawierają się w z zakresie $(0, 1)$.

Natomiast zmienne drugorzędowe mają wartość różną od wartości progowej ($x_s \neq \theta_s$), przez co ich zmienne przełączające mają wartość równą 0 lub 1. Dla układu produkcji białka, uwzględniającego wyłącznie procesy produkcji i degradacji, pochodna czasowa może przyjąć postać:

$$\frac{dx_i}{dt} = p_i(X) - (r_i + d_i(X))x_i, \quad i = 1, \ldots, n, \tag{3.39}$$

gdzie zarówno produkcja (p_i), jak i degradacja (d_i) zależą od stanu układu X, a jednocześnie każdy związek ma stałą degradację podstawową (r_i), niezależną od stanu układu, która gwarantuje stabilność podukładów. W danym Δ-regionie warunek na stan ustalony jest następujący:

$$0 = p_i(\mathbf{Z}) - (r_i + d_i(\mathbf{Z}))x_i. \tag{3.40}$$

Dla zmiennych pierwszorzędowych w granicy $\delta \to 0$ wartość $x_p \to \theta_p$, zatem warunek na stan ustalony jest następujący:

$$0 = p_p(\mathbf{Z}) - (r_p + d_p(\mathbf{Z}))\theta_p, \tag{3.41}$$

natomiast dla zmiennych drugorzędowych stan ustalony jest opisanych następującym równaniem:

$$0 = p_s(\mathbf{Z}) - (r_{sp} + d_s(\mathbf{Z}))x_s, \tag{3.42}$$

przy czym wektor zmiennych $\mathbf{Z}$, występujący w obydwóch równaniach, może zawierać zarówno zmienne przełączające zmiennych pierwszorzędowych ($\mathbf{Z_p}$), jak i drugorzędowych ($\mathbf{Z_s}$). W niniejszym układzie występują następujące niewiadome: wartości pierwszorzędowych zmiennych przełączających $\mathbf{Z_p}$ oraz dokładne wartości drugorzędowych zmiennych stanu x_s. Wartości zmiennych drugorzędowych można wyznaczyć z równania (3.42):

$$x_s = \frac{p_s(\mathbf{Z})}{(r_s + d_s(\mathbf{Z}))}. \tag{3.43}$$

Drugorzędowe zmienne stanu muszą mieć wartość zawierająca się w analizowanym Δ-regionie, ponieważ w innym przypadku trajektorie opuszczą analizowaną podprzestrzeń układu. Po podstawieniu do równań (3.41) - (3.42) wartości drugorzędowych zmiennych przełączających (wynikających z lokalizacji Δ-regionu) istnieje możliwość wyznaczenia wartości pierwszorzędowych zmiennych przełączających ($\mathbf{Z_p}$). Podsumowując, punkt SSP występuje w danym Δ-regionie dla małych $\delta > 0$, jeśli są spełnione następujące warunki:

1. wartości pierwszorzędowych zmiennych przełączających zawierają się w zakresie $(0, 1)$: $0 < \mathbf{Z_p} < 1$;
2. wartości drugorzędowych zmiennych stanu x_s położone są w zakresie danego Δ-regionu.

Zbadanie stabilności punktu SSP

Po wyliczeniu dokładnej lokalizacji punktu SSP w granicy $\delta \to 0$ oraz wartości zmiennych przełączających Z_p konieczne jest określenie stabilności punktu. W przypadku prostych układów (zawierających tylko produkcję i degradację) określenie stabilności punktu SSP jest proste i wymaga wyliczenia wartości własnych macierzy logoid-Jacobiego.W układach

złożonych metoda ta jest nieskuteczna, ponieważ macierz logoid-Jacobiego nie uwzględnia bezpośrednich oddziaływań. Wyznacznik macierzy logoid-Jacobiego jest równy zero i nie uwzględnia pełnej dynamiki układu, dlatego, w tym przypadku, nie można na jego podstawie wnioskować o charakterze punktu SSP. Aby określić zachowanie układu w pobliżu punktu SSP, postuluję wykonanie symulacji numerycznych, dla wartości początkowych bliskich punktowi stacjonarnego. Występowanie oscylacji wokół punktu stacjonarnego, sugeruje, że jest to punkt typu centrum, który jest na granicy stabilności.

Algorytm wyznaczenia osobliwych punktów stacjonarnych w prostych układach na przecięciu dwóch lub więcej granic jest następujący: **dla każdego Δ-regionu, dla którego wyznacznik macierzy logoid-Jacobiego jest niezerowy:**

1. stwórz równania opisujące stan stacjonarny w danym Δ-regionie poprzez zastąpienie pierwszorzędowych zmiennych stanu przez ich wartości progowe (θ_p) oraz drugorzędowych zmiennych przełączających Z_s przez wartości 0 lub 1, zgodnie z lokalizacją Δ-regionu;

2. wylicz wartości pierwszorzędowych zmiennych przełączających Z_p i sprawdź warunek $Z_p \in (0, 1)$;

3. wylicz wartości drugorzędowych zmiennych stanu x_s i sprawdź, czy są zawarte w odpowiednim Δ-regionie;

4. wylicz wartości własne macierzy logoid-Jacobiego i sprawdź, czy punkt jest lokalnie stabilny.

Przebieg procesu znajdowania punktu SSP można przedstawić w formie diagramu (Rysunek 3.5).

Analiza przykładowych układów pod względem występowania punktów SSP

Należy zwrócić uwagę, że stabilność danego punktu ma duże znaczenie dla charakteru układu. Na poniższych przykładach przedstawiłam wpływ stabilności punktu SSP na dynamikę układu.

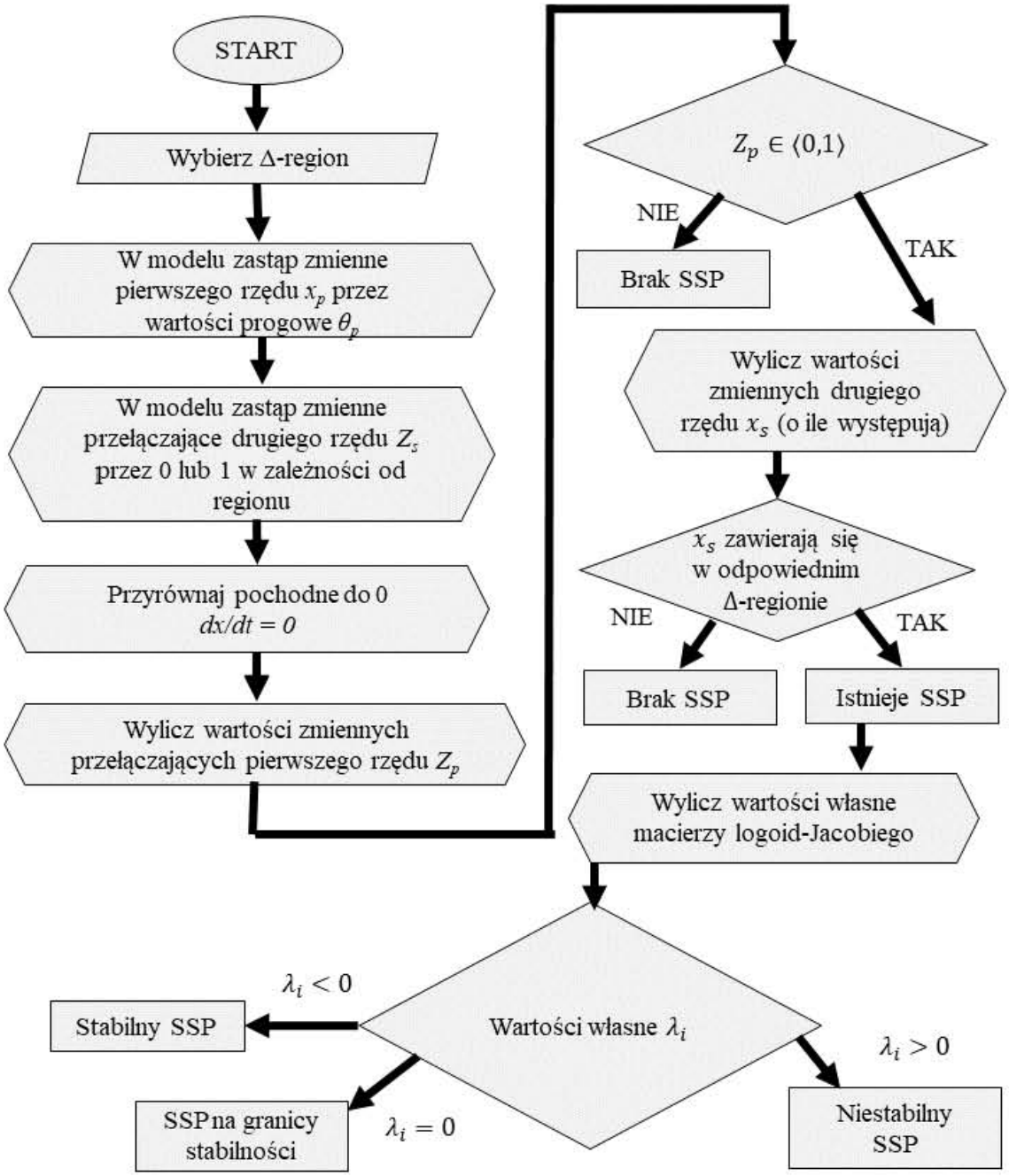
Przykład 1. W przypadku punktu SSP pierwszego wymiaru, określenie jego stabilności jest bardzo proste. Dla układu opisanego równaniem (3.25), logoid-Jacobian ma postać identyczną z równaniem (3.28). Zatem,

$$det\,[\lambda + p_1] = 0, \tag{3.44}$$

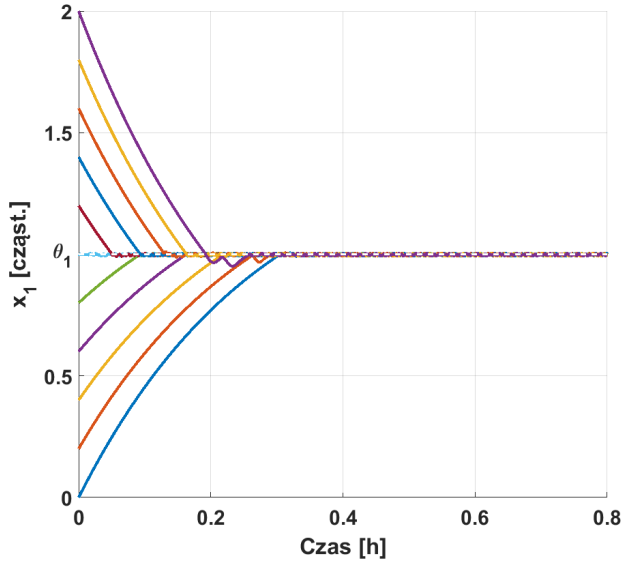
$$\lambda = -p_1. \tag{3.45}$$

Ujemna wartość własna macierzy świadczy o stabilności punktu równowagi na czarnej ścianie. Oznacza to, że w układzie wszystkie trajektorie będą się zbiegały do wartości progowej. Odpowiedź układu z czarną ścianą opisanego równaniem (3.25), o parametrach: $p_1 = 1.5 \cdot 10^{-3}\frac{1}{s}; d_1 = 1 \cdot 10^{-3}\frac{1}{s}; \theta = 1\,\text{cząst.}$; dla różnych warunków początkowych jest przedstawiona na Rysunku 3.6.

W przypadku układów, w których występuje więcej zmiennych i więcej wartości progowych, dynamika wokół punktu stacjonarnego może być bardziej skomplikowana.



Rysunek 3.5: Algorytm znajdowania punktów SSP w układzie PLDE



Rysunek 3.6: Przebieg trajektorii w układzie ze stabilnym punktem SSP pierwszego wymiaru (odpowiedź dla różnych warunków początkowych)

Przykład 2. W układzie opisanym równaniami:

$$\frac{dx_1}{dt} = p_{11} + p_{12}(1 - Z_2) - d_1 x_1, \tag{3.46}$$

$$\frac{x_2}{dt} = p_{21} + p_{22} Z_1 - d_2 x_2, \tag{3.47}$$

dla parametrów: $p_{11} = 0.01\frac{1}{s}$; $p_{12} = 0.01\frac{1}{s}$; $p_{21} = 0.01\frac{1}{s}$; $p_{22} = 0.01\frac{1}{s}$; $d_1 = 0.015\frac{1}{s}$; $d_2 = 0.015\frac{1}{s}$; $\theta_1 = 1\,\text{cząst.}$; $\theta_2 = 1\,\text{cząst.}$, na przecięciu wartości granicznych znajduje się punkt SSP, który można wyznaczyć postępując zgodnie z zaprezentowanym wcześniej algorytmem. Macierz logoid-Jacobiego ma następującą formę:

$$\mathbf{L} = \frac{\partial \mathbf{F}}{\partial \mathbf{Z}} = \begin{bmatrix} 0 & -p_{12} \\ p_{22} & 0 \end{bmatrix}. \tag{3.48}$$

Wyznacznik tej macierzy jest niezerowy, zatem należy sprawdzić wartości zmiennych przełączających Z_1 i Z_2 w niniejszym regionie. Rozwiązując układ równań:

$$0 = p_{11} + p_{12}(1 - Z_2) - d_1\theta_1, \tag{3.49}$$

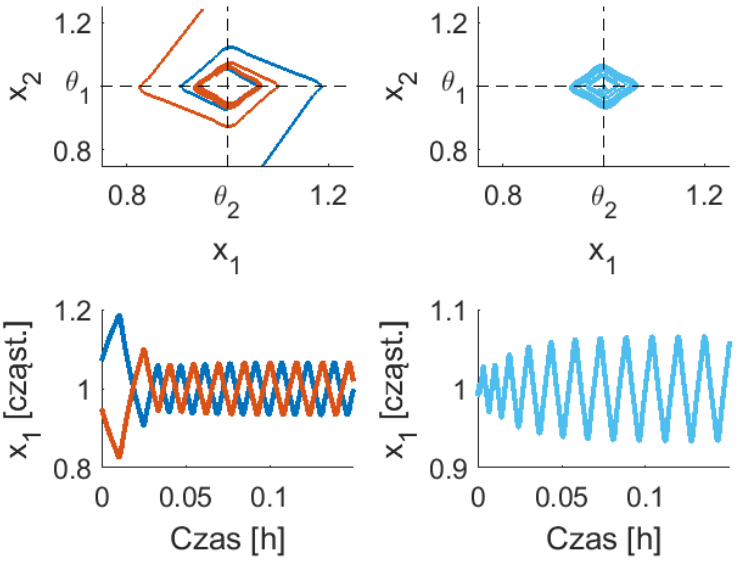
$$0 = p_{21} + p_{22} Z_1 - d_2\theta_2, \tag{3.50}$$

otrzymuje się wartości zmiennych:

$$Z_1 = \frac{d_2\theta_2 - p_{21}}{p_{22}} = 0.5 \tag{3.51}$$

$$Z_2 = \frac{p_{11} + p_{12} - d_1\theta_1}{p_{12}} = 0.5. \tag{3.52}$$

Wartości te mieszczą się w zakresie $[0, 1]$. W regionie tym nie występują zmienne drugorzędowe x_s, więc pomijamy krok wyznaczania ich wartości. Na przecięciu wartości granicznych



Rysunek 3.7: Odpowiedź przykładowego układu opisanego równaniami (3.46) - (3.47) z punktem SSP typu centrum. Pierwszy wiersz: trajektorie w przestrzeni stanu; drugi wiersz: przebiegi czasowe zmiennej x_1; pierwsza kolumna: dwie trajektorie startujące z punktów odległych od wartości granicznych, druga kolumna: trajektoria startująca z punktu blisko przecięcia wartości granicznych

znajduje się punkt SSP. Aby sprawdzić jego stabilność, należy wyznaczyć wartości własne macierzy logoid-Jacobiego:

$$det(\lambda \mathbb{1} - \mathbf{L}) = det \begin{bmatrix} \lambda & p_{12} \\ -p_{22} & \lambda \end{bmatrix} = \lambda^2 + p_{12}p_{22}. \tag{3.53}$$

$$\lambda = \sqrt{-p_{12}p_{22}} \tag{3.54}$$

$$\lambda_1 = 0.01i \qquad \lambda_2 = -0.01i. \tag{3.55}$$

Wartości własne macierzy mają zerowe wartości rzeczywiste, zatem punkt ten jest typu centrum, a układ jest na granicy stabilności. Trajektorie układu oscylują wokół przecięcia wartości granicznych, dla różnych warunków początkowych. Amplituda i częstotliwość oscylacji nie zależą od warunku początkowego. Na Rysunku 3.7 w pierwszym wierszu pokazane są trajektorie w przestrzeni stanu x_1 i x_2, a w drugim wierszu przebiegi czasowe zmiennej x_1. Pierwsza kolumna pokazuje odpowiedź układu dla warunków początkowych dalekich od wartości progowych, a druga kolumna pokazuje odpowiedź dla przebiegów czasowych bliskich wartości progowej. Niezależnie od warunków początkowych, trajektoria oscylacji ma taką samą amplitudę i okres.

Przykład 3. W układzie ze punktem SSP typu siodło dynamika jest zdecydowanie inna niż w poprzednim przykładzie. Rozważmy następujący układ:

$$\frac{x_1}{dt} = p_{11} - (d_{11} + d_{12}Z_2)x_1, \tag{3.56}$$

$$\frac{x_2}{dt} = p_{21} - (d_{21} + d_{22}Z_1)x_2, \tag{3.57}$$

o wartościach parametrów $p_1 = 0.02\frac{1}{s}$; $p_2 = 0.02\frac{1}{s}$; $d_{11} = 0.01\frac{1}{s}$; $d_{12} = 0.1\frac{1}{s}$; $d_{21} = 0.01\frac{1}{s}$; $d_{22} = 0.1\frac{1}{s}$; $\theta_1 = 1\,\text{cząst.}$; $\theta_2 = 1\,\text{cząst.}$ Dla niniejszego modelu macierz logoid-Jacobiego jest następująca:

$$\mathbf{L} = \frac{\partial \mathbf{F}}{\partial \mathbf{Z}} = \begin{bmatrix} 0 & -d_{12}x_1 \\ -d_{22}x_2 & 0 \end{bmatrix}. \tag{3.58}$$

Analogicznie jak we wcześniejszym przykładzie można wyznaczyć wartości zmiennych przełączających na przecięciu wartości progowych, czyli w Δ-regionie θ_1, θ_2. Wartości przełączające są następujące:

$$Z_1 = \frac{p_2 - d_{21}\theta_2}{d_{22}\theta_2} = 0.1, \tag{3.59}$$

$$Z_2 = \frac{p_1 - d_{11}\theta_1}{d_{12}\theta_1} = 0.1, \tag{3.60}$$

zatem na przecięciu wartości progowych znajduje się osobliwy punkt stacjonarny. Jego stabilność można określić poprzez wyznaczenie wartości własnych macierzy logoid-Jacobiego:

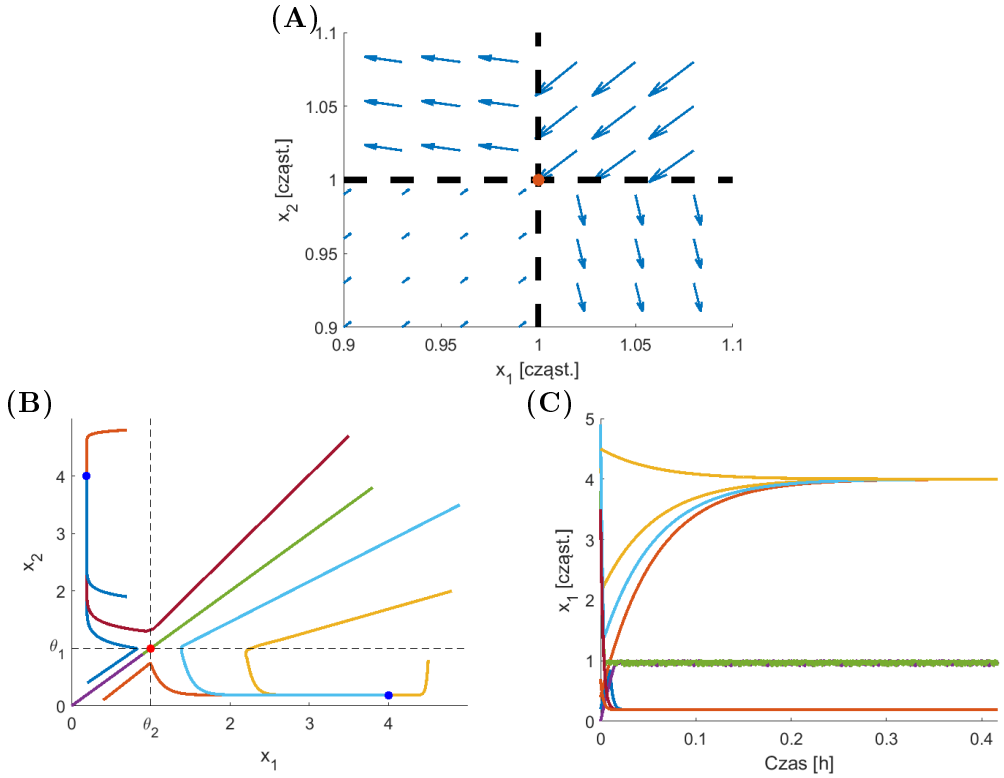
$$det(\lambda \mathbb{1} - \mathbf{L}) = det \begin{bmatrix} \lambda & d_{12}\theta_1 \\ d_{22}\theta_2 & \lambda \end{bmatrix} = \lambda^2 - d_{12}d_{22}\theta_2\theta_2. \tag{3.61}$$

$$\lambda = \sqrt{d_{12}d_{22}\theta_1\theta_2}, \tag{3.62}$$

$$\lambda_1 = -0.1; \quad \lambda_2 = 0.1. \tag{3.63}$$

Jedna wartość własna jest ujemna, a druga dodatnia, co oznacza, że punkt SSP jest niestabilny typu siodło. Jest to widoczne na wykresie pola trajektorii w bliskiej okolicy punktu SSP (Rysunek 3.8A). Jeśli warunki początkowe znajdują się dokładnie na przekątnej $(x_1 = x_2)$, to trajektorie zmierzają do punktu na przecięciu wartości progowych. Natomiast, jeśli warunki początkowe znajdują poza przekątną, to trajektorie zmierzają do zwyczajnych punktów stacjonarnych. Na Rysunku 3.8 przedstawione zostały trajektorie w przestrzeni stanu (Rysunek 3.8B) oraz przebiegi czasowe (Rysunek 3.8C) dla różnych warunków początkowych. Dla warunków początkowych znajdujących się na przekątnej $x_1 = x_2$ układ dąży do punktu SSP, znajdującego się na przecięciu wartości progowych (czerwona kropka na wykresie), natomiast dla wszystkich innych wartości początkowych układ dąży do jednego z dwóch zwyczajnych punktów stacjonarnych (oznaczonych na niebiesko). Na przebiegach czasowych dla przedstawionego układu wyraźnie widoczne jest istnienie trzech punktów stacjonarnych (Rysunek 3.8C).

Powyższe przykłady pokazują, że w zależności od stabilności punktu równowagi, obserwuje się różne zachowanie w okolicy punktu SSP, a znaczenie wartości własnych macierzy logoid-Jacobiego jest analogiczne, jak w przypadku wartości własnych macierzy stanu układów bez przełączeń. Należy zwrócić uwagę, że występowanie punktu SSP na granicy



Rysunek 3.8: Odpowiedź przykładowego układu opisanego równaniami (3.56) - (3.57) z punktem SSP typu siodło; (A) Pole trajektorii w okolicy punktu SSP; (B) Trajektorie w przestrzeni stanu; (C) Przebiegi czasowe zmiennej x_1 (kolory przebiegów odpowiadają trajektoriom na wykresie C)

stabilności nie jest jednoznaczne z obecnością stabilnego cyklu granicznego w układzie. W układach zawierających kilka wartości progowych, teoretyczna trajektoria cyklu wokół punktu SSP może być przerwana przez zderzenie z granicą domeny, gdzie występuje zmiana podsystemu. Sam fakt istnienia punktu SSP w danym Δ-regionie nie gwarantuje występowania basenu przyciągania wokół niego, dlatego, po wyliczeniu lokalizacji punktów SSP, konieczne jest numeryczne potwierdzenie występowania oscylacji w układzie.

3.3.4 Analiza bifurkacyjna

Zjawisko bifurkacji występujące w danym układzie oznacza skokową zmianę własności modelu matematycznego przy drobnej, ciągłej zmianie wartości jego parametrów lub warunków początkowych. Analiza bifurkacyjna pozwala na zbadanie wpływu danego parametru na odpowiedź układu i pokazuje możliwość wystąpienia jakościowej zmiany jego zachowania. W układach kawałkami liniowych możliwe jest dokładne wyznaczenie punktów stacjonarnych RSP oraz SSP, a także zakresu wartości parametrów, dla jakich te punkty występują. Dzięki temu wykonanie analizy bifurkacyjnej jest łatwiejsze, a stworzenie diagramu bifurkacyjnego polega na naniesieniu na wykres wyliczonych punktów stacjonarnych RSP i SSP dla wyliczonych zakresów parametru. Taka analiza jest przedstawiona w dalszej części pracy.

3.4 Heterogeniczność populacji komórkowej

Analiza i modelowanie układów biologicznych są niezwykle trudne ze względu na dużą heterogeniczność, którą można obserwować na wszystkich poziomach skomplikowania: zróżnicowanie pomiędzy poszczególnymi osobnikami tego samego gatunku, zróżnicowanie pomiędzy różnymi organami czy tkankami, a nawet zróżnicowanie komórek w obrębie jednej linii. Heterogeniczność populacji komórkowej oznacza, że komórki o pełniące tę samą funkcje w organizmie i w jednakowych warunkach środowiskowych zachowują się w różny sposób. Zróżnicowanie między komórkami wynika między innymi z różnej wrażliwości na czynniki zewnętrzne. Przykładowo, w niektórych komórkach dany czynnik stresowy wywołuje apoptozę, a w niektórych tylko blokadę cyklu i naprawę uszkodzeń. Aktywacja procesów komórkowych jest zależna od poziomów różnych związków organicznych i nieorganicznych oraz szeregu czynników fizyko-chemicznych. Regulacja procesów biologicznych jest na ogół wieloczynnikowa, przez co konieczna jest obecność wielu różnych molekuł, aby zapewnić prawidłowy ich przebieg. W rezultacie aktywacja danego procesu (np. produkcji białka) może zachodzić w komórkach przy różnych stężeniach czynnika regulatorowego, ze względu na stężenie innych molekuł, również biorących udział w reakcji.

Ze względu na duże zróżnicowanie populacji komórkowej, zastosowanie wyłącznie modelowania deterministycznego nie pozwala w pełni scharakteryzować badanych systemów biologicznych. Według mojej najlepszej wiedzy, metody pozwalające na zbadanie właściwości populacji heterogenicznej przy pomocy układów kawałkami liniowych, nie zostały jeszcze zaproponowane w literaturze. Z tego względu, zaproponowałam własny algorytm symulacji zachowania populacji heterogenicznej przy wykorzystaniu układów kawałkami liniowych.

3.4.1 Modelowanie populacji heterogenicznej przy wykorzystaniu układów z przełączeniami

W zaproponowanym algorytmie postuluję, aby różnice występujące między poszczególnymi komórkami zamodelować poprzez zróżnicowanie wartości progowych w układach kawałkami liniowych. Ze względu na mniejsze lub większe stężenie różnych substancji (np. inhibitorów reakcji), aktywacja procesu komórkowego może wymagać niższego lub wyższego stężenia czynnika regulatorowego, niż w typowej komórce o nominalnych stężeniach substancji. Na przykład, w komórce o wysokim poziomie inhibitora danego czynnika transkrypcyjnego, który powoduje jego dezaktywację poprzez tworzenie kompleksów, aby stężenie niezwiązanego czynnika transkrypcyjnego osiągnęło poziom konieczny do aktywacji genu danego białka, konieczny jest znacznie wyższy całkowity poziom tego czynnika, niż w normalnej komórce.

Dla stworzenia populacji komórkowej o zróżnicowanych właściwościach, wartości progowe dla każdej z komórek opisuje się funkcja losową z wybranego rozkładu. Wartości progowe odpowiadają stężeniu (lub liczbie cząsteczek) czynnika regulatorowego, przy którym następuje aktywacja procesu, zatem obniżenie wartości progowej oznacza, że proces w danej komórce jest aktywowany przy niższych stężeniach (licznościach) czynnika regulatorowego, a podwyższenie wartości progowej odpowiada zwiększeniu poziomu czynnika regulatorowego, koniecznego do aktywacji danego procesu. Wykonanie symulacji wielu komórek o zróżnicowanych wartościach progowych pozwala na zamodelowanie heterogenicznej popu-

lacji, złożonej zarówno z komórek zarówno o niskiej, jak i wysokiej wrażliwości na czynniki regulatorowe.

3.4.2 Rozkład normalny i centralne twierdzenie graniczne

W proponowanym algorytmie postuluję, aby zróżnicowanie wartości progowych opisać poprzez rozkład normalny (rozkład Gaussa). Rozkład normalny jest bardzo często stosowany do opisu zmienności w naturze, na przykład do opisu danych w naturze, medycynie czy przemyśle. Zróżnicowanie właściwości komórki wynika z wpływu wielu różnych czynników, zatem do jego opisu można zastosować centralne twierdzenie graniczne. Mówi ono o tym, że jeśli doda się do siebie znaczną liczbę zmiennych losowych, to w wyniku otrzymuje się zmienną losową o rozkładzie normalnym, praktycznie niezależnie od tego, jakie mają one rozkłady prawdopodobieństwa [66]. Zakładając zmienną losowa o postaci:

$$r = \frac{\frac{1}{n}\Sigma_{i=1}^{n} X_i - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}}, \tag{3.64}$$

gdzie X_i to niezależne zmienne losowe, o takiej samej wartości oczekiwanej μ oraz dodatniej, skończonej wariancji σ^2, to przy $n \to \infty$, zmienna losowa zbiega według rozkładu do standardowego rozkładu normalnego. Centralne twierdzenie graniczne jest jednym z najważniejszych twierdzeń rachunku prawdopodobieństwa, ponieważ uzasadnia powszechne występowanie w przyrodzie rozkładów zbliżonych do rozkładu normalnego.

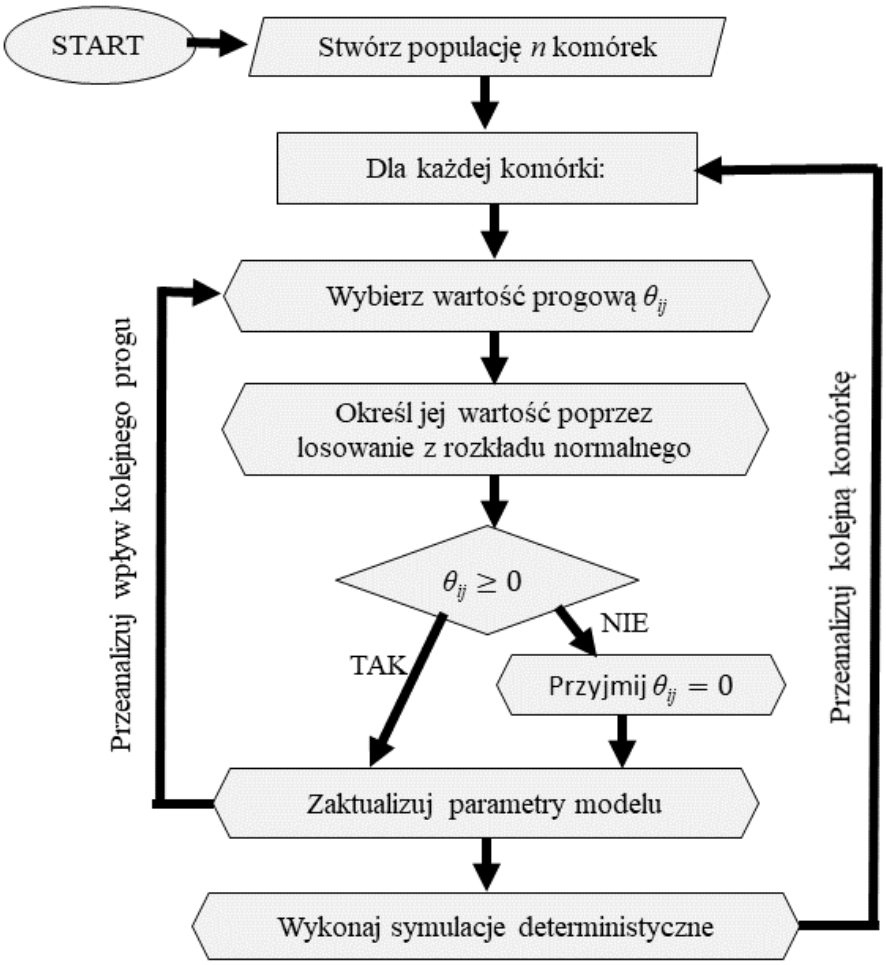
3.4.3 Algorytm symulacji heterogenicznej populacji komórkowej

Zaproponowany algorytm symulacji bazuje na symulacjach deterministycznych, a zróżnicowanie komórek między sobą występuje jedynie w wyniku różnego ułożenia wartości progowych. Dzięki takiemu podejściu czas symulacji jest stosunkowo krótki i zależy od skomplikowania modelu oraz wielkości populacji. Kolejne kroki algorytmu są następujące: **dla każdej z n komórek w populacji:**

1. wybierz wartość progową θ_{ij}, która będzie losowana;
2. określ wartość progu, poprzez losowanie z rozkładu normalnego:

$$f_{\mu,\sigma}(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} e^{\frac{-(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}, \tag{3.65}$$

   gdzie wartość średnia jest równa nominalnej wartości progowej $\mu = \theta_{ij}$, a odchylenie standardowe (σ) jest dobierane dowolnie, jako procentowy udział nominalnej wartości progowej;
3. sprawdź, czy wartość progowa nie jest ujemna, jeśli tak przyjmij $\theta_{ij} = 0$;
4. jeśli chcesz stworzyć model z kilkoma losowymi wartościami progowymi wróć do punktu 2;
5. wykonaj symulacje deterministyczne;
6. wróć do punktu 1.



Rysunek 3.9: Algorytm symulacji populacji heterogenicznej przy wykorzystaniu układów PLDE

Zaproponowany algorytm przedstawiony został również na schemacie (Rysunek 3.9). W zależności od stopnia skomplikowania modelu, w układzie może występować różna liczba wartości progowych. Zaproponowana metoda pozwala na badanie zróżnicowania populacji komórkowej w zależności od dowolnej wartości progowej lub zbioru kilku wartości progowych. Ponadto stopnień zróżnicowania można dobierać indywidualnie dla każdej wartości progowej.

Ze względu na zastosowanie rozkładu normalnego, losowane wartości progowe mogą przyjąć wartości ujemne. Wartości progowe mają określone znaczenie biologiczne — stężenie lub liczba cząsteczek, przy której następuje aktywacja procesu — dlatego konieczne jest zapewnienie, aby wartość progowa θ nie przyjmowała wartości ujemnych. Algorytm zakłada sprawdzenie, czy wartość progowa jest większa od 0, jeśli nie, to jej wartość jest zastępowana zerem (punkt 4 algorytmu). Z praktycznego punktu widzenia sprowadza się to do usunięcia danej wartości progowej z układu, ponieważ modelowane układy biologiczne są wyłączenie dodatnie, a przejście trajektorii do domeny o wartościach mniejszych od 0 nie jest możliwe.

Wartości progowe dla danej komórki są stałe i nie zmieniają się w czasie symulacji, tak więc sam przebieg czasowy ma charakter deterministyczny. Jedyna pojawiająca się losowość wynika z ułożenia wartości progowych. Wynikiem zastosowania niniejszego algorytmu jest zbiór deterministycznych przebiegów czasowych, z których każdy odpowiada zachowaniu innej komórki. Dalszym możliwym rozwinięciem tego algorytmu jest zmiana wartości progowych w każdym kroku algorytmy lub co pewien określony czas. Pozwoliłoby to odwzorować zmianę stężeń czynników regulatorowych itp. w czasie w pojedynczych komórkach, co jeszcze bardziej przybliżyłoby otrzymane wyniki do rzeczywistości.

3.5 Modele kawałkami liniowe z losowym przełączeniem

Reakcje wewnątrzkomórkowe, tak jak reakcje chemiczne, są procesami losowymi, zależnymi od chaotycznych ruchów cząsteczek oraz zderzeń reagentów i katalizatorów. Losowość procesów ma szczególne znaczenie w przypadku reakcji zachodzących między reagentami małolicznymi w danym środowisku. Szczególnym przypadkiem mogą być geny, które w komórkach ludzkich najczęściej występują w dwóch kopiach, zatem losowa aktywacja i dezaktywacja genu znacząco wpływa na liczbę cząsteczek mRNA, a co za tym idzie poziom białka w układzie.

W celu zamodelowania takiego zjawiska, wykorzystując teorię układów kawałkami deterministycznych, zaproponowałam algorytm modelowania układów ze stochastycznymi przełączeniami. Zaproponowany algorytm bazuje na modelach typu *flow with jumps*, w których dynamika pomiędzy losowymi przełączeniami jest opisana przez ciągłe modele deterministyczne [55].

3.5.1 Modele kawałkami deterministyczne

W prostych modelach kawałkami deterministycznych, czyli takich z losowym przełączeniem, istnieje możliwość analitycznego wyznaczenia trajektorii oraz rozkładu prawdopodobieństwa czasu przebywania w poszczególnych stanach układu. Przykładowy system produkcji uwzględniający stochastykę przełączeń genu został przedstawiony w [55]. Model ten przedstawia produkcję białka P regulowaną przez pojedynczy gen, przy ominięciu etapu produkcji mRNA. Model jest opisany jednym równaniem:

$$\frac{P(t)}{dt} = p_1 A(t) - d_1 P(t), \tag{3.66}$$

gdzie p_1 to tempo produkcji, a d_1 to tempo degradacji białka. Stan genu A jest zależny od czasu, zatem gen może występować w formie aktywnej (wartość 1) lub nieaktywnej (wartość 0). Zatem zmienna A w nomenklaturze przyjętej w niniejszej pracy odpowiada zmiennej przełączającej Z. W procesie występują skokowe zmiany wartości, gdy gen zmienia swoją aktywność. W układzie z nieaktywnym genem, rozwiązanie analityczne poziomu białka w czasie jest następujące:

$$P(t, P_0, A = 0) = P_0 e^{-d_1 t}, \tag{3.67}$$

natomiast w układzie z aktywnym genem rozwiązanie analityczne ma postać:

$$P(t, P_0, A = 1) = \frac{p_1}{d_1} + \left(P_0 + \frac{p_1}{d_1} \right) e^{-d_1 t}, \tag{3.68}$$

gdzie P_0 to liczba cząsteczek białka w momencie aktywacji lub dezaktywacji genu. W pracy [55] funkcja rozkładu prawdopodobieństwa czasu przebywania w stanie nieaktywnym jest opisana wzorem:

$$t_s(P_0, A = 0) = 1 - \exp\left(- \int_0^t q_0\Big(P_0 e^{-d_1\tau}\Big) d\tau \right), \tag{3.69}$$

natomiast w stanie aktywnym:

$$t_s(P_0, A = 1) = 1 - \exp\left(- \int_0^t q_1\Big(\frac{p_1}{d_1} + (P_0 + \frac{p_1}{d_1}) e^{-d_1\tau} d\Big)\tau \right). \tag{3.70}$$

Wartości parametrów q_0 i q_1 oznaczają, odpowiednio, tempo aktywacji i dezaktywacji genu. Model ten nie uwzględnia wpływu poziomu białka na aktywację/dezaktywację genu, a prawdopodobieństwo przełączenia genu jest zależne tylko od czasu, dlatego powyższa analiza była możliwa do przeprowadzenia. W modelach z przełączeniami zależnymi od stanu układu, a takie są analizowane w niniejszej rozprawie, wyznaczenie rozkładu gęstości prawdopodobieństwa czasu przebywania w danej domenie jest znacznie trudniejsze, a nawet niemożliwe.

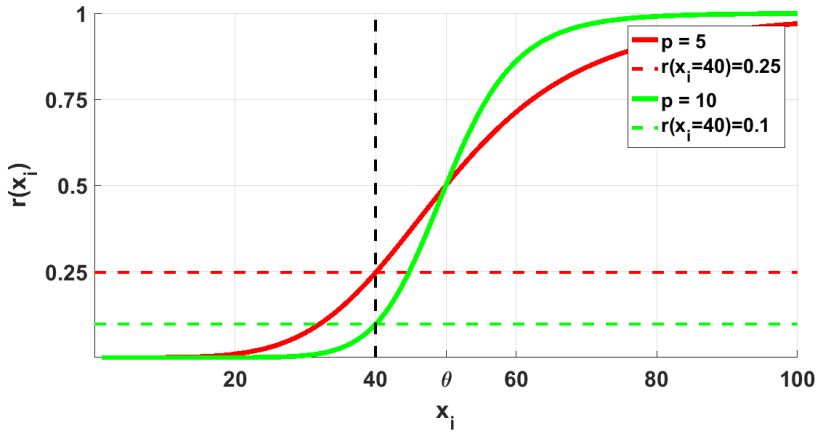
3.5.2 Modele kawałkami deterministyczne z przełączeniami zależnymi od stanu układu

W układach biologicznych zmiana tempa procesu lub aktywacja genów często jest uzależniona od poziomu cząsteczek regulatorowych, co stanowi jedną z podstawowych cech uwzględnionych w modelach. W tym przypadku analiza jest znacznie bardziej skomplikowana, dlatego zaproponowałam algorytm bazujący na symulacjach numerycznych. Algorytm umożliwia symulacje układów z losowym przełączeniem, zależnym od stanu układu, ponieważ łączy deterministyczne symulacje poziomów zmiennych ze stochastycznymi, skokowymi zmianami domen (skutkującymi zmianami parametrów). Do symulacji deterministycznych zmian poziomów białek i mRNA zaproponowałam wykorzystanie algorytmu Rungego-Kutty, natomiast czas przełączenia oraz kolejność podsystemów jest opisana losowymi funkcjami. Do opisu prawdopodobieństwa aktywacji procesu w zależności od liczby cząsteczek czynnika regulatorowego wybrałam funkcję Hilla, ponieważ jej kształt przybliża skok jednostkowy, przez co pozwala modelować aktywację procesu przy wartościach zbliżonych do wartości progowej. Prawdopodobieństwo aktywacji procesów zależnych od białka x_i jest opisane następującą funkcją Hilla:

$$r(x_i) = \frac{x_i^n}{x_i^n + \theta_i^n}, \tag{3.71}$$

gdzie x_i to liczba cząsteczek enzymu, θ_i to wartość progowa odpowiadająca liczbie cząsteczek, przy jakiej prawdopodobieństwo przełączenia jest równe 50%, a n to współczynnik Hilla opisujący stopień nachylenia funkcji. Zmiana wartości współczynnika Hilla w funkcji prawdopodobieństwa pozwala badać wpływ zwiększenia losowości aktywacji/dezaktywacji na przebiegi czasowe i zróżnicowanie odpowiedzi w otrzymanej populacji heterogenicznej.

Jeśli w funkcji prawdopodobieństwa współczynnik Hilla ma niską wartość, to przy poziomie białka poniżej wartości progowej, prawdopodobieństwo aktywacji reakcji jest większe, niż w modelu z wyższymi wartościami współczynnika Hilla (Rysunek 3.10). Natomiast



Rysunek 3.10: Prawdopodobieństwo aktywacji reakcji przy różnych wartościach parametru Hilla

przy wysokich poziomach białka, zachodzi sytuacja odwrotna i przy zmniejszaniu współczynnika Hilla prawdopodobieństwo reakcji spada. Innymi słowy, można powiedzieć, że układ z wysokimi parametrami Hilla w funkcji prawdopodobieństwa jest hiperwrażliwy na wartość progową, a jego odpowiedź będzie zbliżona do odpowiedzi układu deterministycznego z przełączeniami. Dzięki wprowadzeniu różnych wartości współczynnika Hilla można zbadać odpowiedź układu o różnej wrażliwości na czynnik regulatorowy.

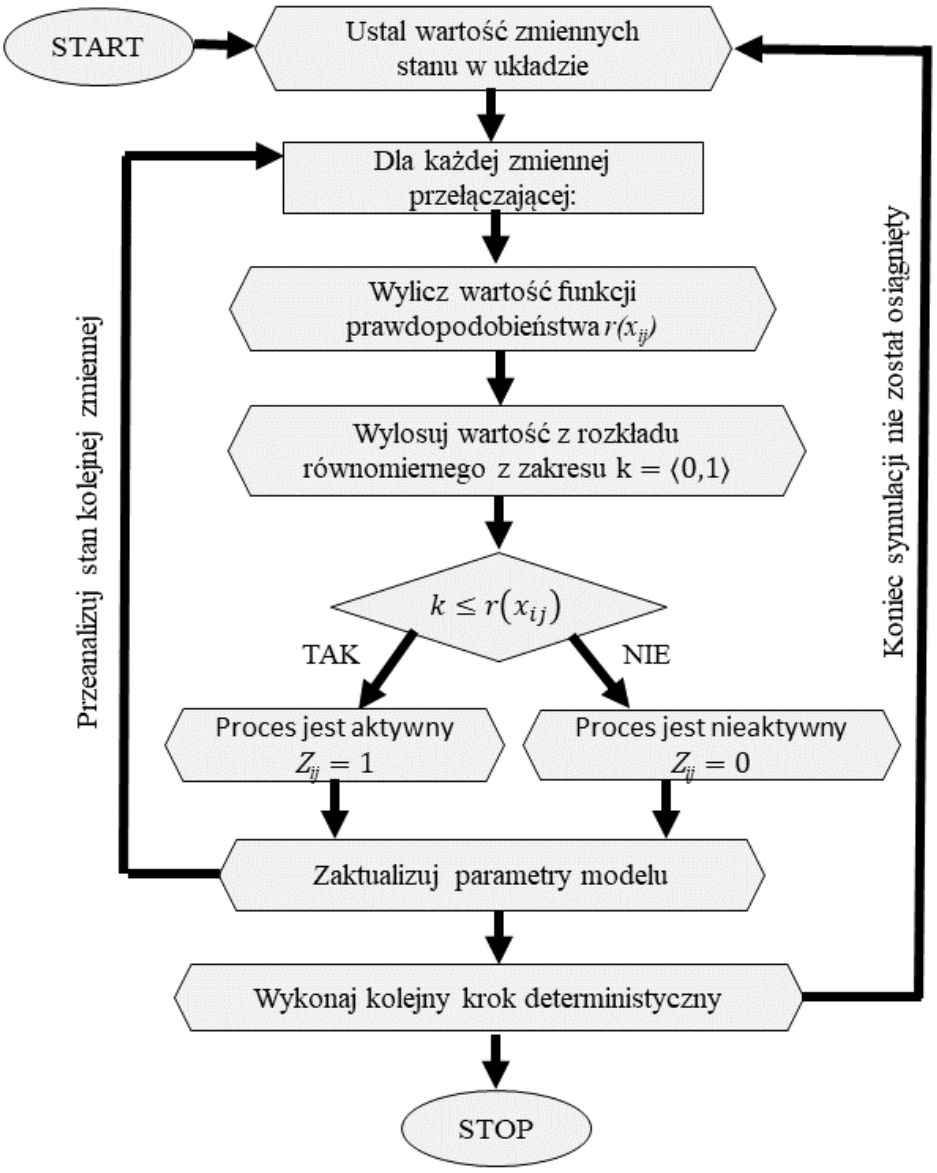
3.5.3 Algorytm symulacji układów z losowymi przełączeniami

Zaproponowany algorytm symulacji losowych przełączeń w systemie jest następujący: **w każdym kroku symulacji deterministycznej:**

1. wylicz wartości funkcji prawdopodobieństwa aktywacji procesów dla danego stanu układu;
2. wylosuj wektor liczb z rozkładu równomiernego w zakresie [0,1] o długości równej liczbie funkcji prawdopodobieństwa, opisujących system ;
3. porównaj wartości liczb losowych z wartościami funkcji prawdopodobieństwa — jeśli liczba losowa jest mniejsza, to proces jest aktywny;
4. dla danego stanu układu wykonaj kolejny krok deterministyczny.

Schemat algorytmu jest przedstawiony na Rysunku 3.11. Algorytm ten ma charakter procesu Markova, gdyż nie uwzględnia poprzednich decyzji, a wybór jest determinowany jedynie przez stan obecny. Ponadto aktywacja i dezaktywacja różnych procesów może zachodzić jednocześnie.

Zaproponowany algorytm pozwala na odtworzenie losowości procesów zachodzących w komórkach, dzięki czemu umożliwia badanie zróżnicowania odpowiedzi całej populacji. W efekcie umożliwia stworzenie modeli odwzorowujących zjawiska występujące w populacji komórkowej, takie jak podział populacji na subpopulacje o różnym charakterze czy desynchronizacja odpowiedzi, co zostanie pokazane na konkretnych przykładach w dalszej części rozprawy.

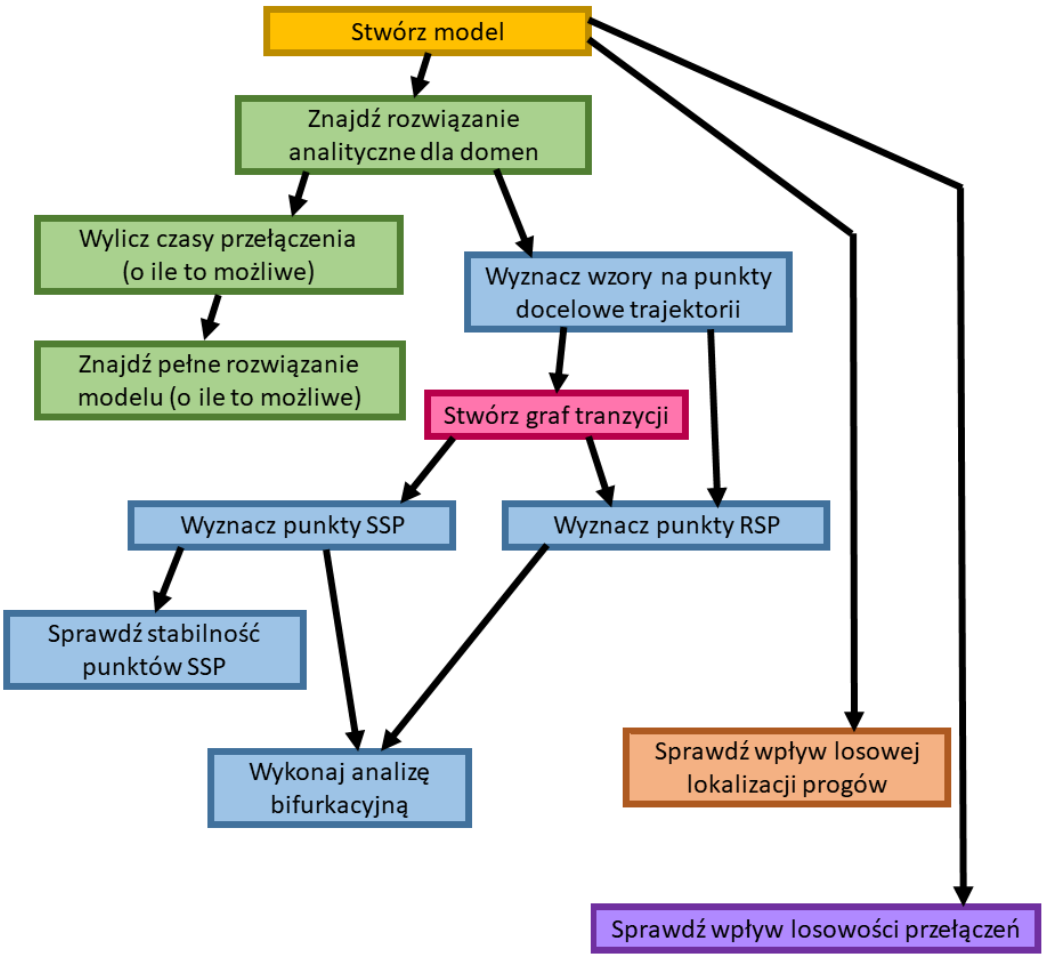


Rysunek 3.11: Algorytm symulacji populacji z losową aktywacją procesów

3.6 Zaproponowany schemat analizy układów z przełączeniami

W niniejszej rozprawie doktorskiej zaproponowałam kompleksowy algorytm analizy biologicznych modeli kawałkami liniowych z przełączeniami przy wykorzystaniu podstawowych metod teorii systemów (np. wyznaczanie rozwiązań analitycznych), literaturowych metod analizy układów kawałkami liniowych oraz autorskich metod symulacji populacji heterogenicznej. Schemat zaproponowanej metody analizy układów z przełączeniami jest przedstawiony na Rysunku 3.12.

Pierwszym krokiem algorytmu jest analityczne rozwiązanie modelu w poszczególnych



Rysunek 3.12: Schemat analizy układów z przełączeniami

domenach oraz (jeśli to możliwe) wyznaczenie czasów przełączenia i rozwiązania analitycznego pełnego układu. Następnie, na podstawie rozwiązań analitycznych w poszczególnych domenach, należy wyznaczyć wzory opisujące lokalizację punktów docelowych, które mogą być wykorzystane do stworzenia grafu tranzycji. Graf taki jest wykorzystywany w jakościowej ocenie zachowania układu i ułatwia wnioskowanie o możliwości wystąpienia punktów stacjonarnych oraz cykli granicznych. Kolejnym krokiem jest wyznaczenie punktów stacjonarnych. W przypadku zwyczajnych punktów stacjonarnych, procedura postępowania jest intuicyjna i wymaga jedynie wyliczenia punktów docelowych i określenia ich lokalizacji względem wartości progowych. Wyznaczenie osobliwych punktów stacjonarnych jest znacznie trudniejsze. W niniejszej pracy proponuję zastosowanie w tym celu algorytmu T. Mestla i in. [17], przy uwzględnieniu, że w przypadku modeli z transportem lub zmianą formy cząsteczki przedstawiona przez nich metoda wykluczenia regionów, w których takie punkty mogą się znajdować, może dawać fałszywie ujemny wynik. Jako uzupełnienie tej metody proponuję pomocniczą procedurę pozwalającą wybrać regiony do dalszej analizy w kierunku występowania punktu SSP. Kolejnym krokiem zaproponowanego algorytmu jest określenie stabilności wyznaczonych osobliwych punktów stacjonarnych, przy czym typy

stabilności punktów są analogiczne jak w układach nieliniowych bez przełączeń (np. węzeł, centrum, siodło). Pełny opis zachowania układu, przy zmianie danego parametru, można uzyskać poprzez wykonanie analizy bifurkacyjnej i wyznaczenie zakresów parametrów, dla których obserwuje się różne typy i różną liczbę punktów stacjonarnych.

W kolejnym kroku analizy układu proponuję wykonanie modelu heterogenicznej populacji, przy wykorzystaniu autorskiego podejścia. W metodzie tej wprowadzona jest losowość w procesie dobierania wartości granic między domenami, co pozwala na odzwierciedlenie zróżnicowania między komórkami, pod względem zdolności do aktywacji procesów, przy różnych stężeniach cząsteczek regulatorowych.

Alternatywnie proponuję wykonanie symulacji układów kawałkami deterministycznych z przełączeniami w celu sprawdzenia wpływu losowości procesów na zróżnicowanie odpowiedzi i osiągalność założonych celów terapeutycznych. Zaproponowany przeze mnie algorytm polega na połączeniu symulacji deterministycznych, wykonywanych przy pomocy algorytmu Rungego-Kutty ze stochastycznymi przełączeniami między domenami. Czas przełączenia oraz kolejność domen są opisane funkcją losową, zależną od stanu układu. Metoda ta pozwala na zbadanie wpływu losowości przełączeń na zróżnicowanie poziomów białek w populacji, wykrycie multistacjonarności oraz zaobserwowanie desynchronizacji odpowiedzi.

Rozdział 4

Opis i analiza prostych modeli produkcji białka

Procesy wewnątrzkomórkowe opierają się głównie na skomplikowanych oddziaływaniach międzybiałkowych, które pełnią szereg istotnych funkcji w organizmie [27]. Ze względu na kluczowe znaczenie białek w prawidłowym funkcjonowaniu komórki, wybrałam system produkcji białka, jako pierwszy przykład analizowanego systemu biologicznego. Ponadto bardziej złożone modele, uwzględniające poziomy różnych białek, posiadają również etap produkcji białek. Stworzony przeze mnie model może być zatem elementem bardziej skomplikowanych sieci, a poznanie jego właściwości może być ułatwieniem w czasie modelowania bardziej skomplikowanych układów. Ponadto pomimo prostoty układu, można pokazać na nim oba typy sprzężenia zwrotnego – dodatnie i ujemne.

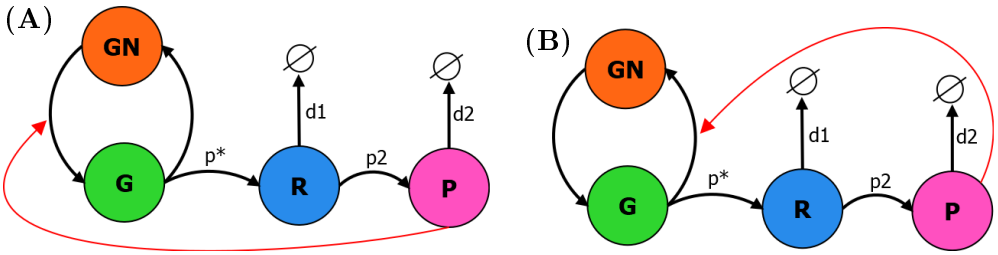
W niniejszym rozdziale zostały przedstawione proste modele produkcji białka uwzględniające dwa różne typy autoregulacji. Względna prostota tych modeli niesie ze sobą dwie główne zalety: możliwość dokładnego przebadania właściwości różnych typów autoregulacji w systemach produkcji białka oraz klarowny i prosty sposób prezentacji zaproponowanej metodologii analizy układów kawałkami liniowych. W niniejszych modelach uwzględniłam procesy wewnątrzkomórkowe oraz wymuszenia zewnętrzne. Do modelowania sprzężeń zwrotnych dodatnich i ujemnych wykorzystałam przełączenia zależne od stanu układu, z kolei oddziaływania zewnętrzne zamodelowałam poprzez przełączenia zależne od czasu.

4.1 Model produkcji białka

Produkcja białek jest procesem wieloetapowym, skomplikowanym i regulowanym przez szereg różnych czynników. Zgodnie z centralnym dogmatem biologii molekularnej sformułowanym w 1957 r. przez F. Cricka [67], informacja genetyczna jest przechowywana w DNA, na podstawie którego tworzone jest RNA (a dokładnie mRNA - *messenger RNA*), a następnie białko.

Podstawowy model produkcji białka również powinien zawierać zmienne takie jak: gen (funkcjonalna cząsteczka DNA), mRNA oraz białko. Większość genów w komórce występuje w dwóch kopiach (allelach), a każda z nich może być w stanie aktywnym (G) lub nieaktywnym (G_N). W zależności od liczby aktywnych genów tempo powstawania mRNA będzie różne: zero (gdy oba geny są nieaktywne), wolne (jeden z genów aktywny) lub szybkie (dwa geny aktywne). W zaproponowanym modelu rozważam zmianę stanu pomiędzy

jednym a dwoma aktywnymi genami (pomijam stan, w którym oba geny są nieaktywne), ponieważ przy dwóch genach nieaktywnych poziom białka zmierza do 0, a wiele białek występuje na niskim, ale niezerowym, podstawowym poziomie. Jednocześnie, uwzględniając tylko dwa stany chciałam zachować prostą strukturę modelu. Stan genu, ze względu na swój binarny charakter, jest modelowany jako skokowa zmiana wartości. Jeden gen jest stale aktywny, a drugi zmienia się binarnie przyjmując wartość 0 lub 1. Model nie zawiera bezpośrednio zmiennej oznaczającej gen, ale jego stan jest uwzględniony w wartości tempa produkcji mRNA. Zatem, zaproponowany model zawiera dwie zmienne – mRNA (R) oraz białko (P). Model uwzględnia procesy degradacji, czyli rozkładu obydwu rodzajów cząsteczek: mRNA i białka. Współczynnik tempa produkcji białka jest stały, dlatego tempo produkcji zależy tylko od liczby cząsteczek mRNA. Do analizowanego systemu produkcji



Rysunek 4.1: Model produkcji białka; (A) ze sprzężeniem dodatnim; (B) ze sprzężeniem ujemnym

białka wprowadziłam dwa rodzaje przełączeń:

- przełączenie zależne od stanu układu – aktywacja lub dezaktywacja genu zależy od stanu układu, czyli liczby cząsteczek białka;
- przełączenie zależne od czasu – podanie leku zwiększa skokowo degradację białka, w celu obniżenia jego poziomu.

Przełączenie zależne od stanu układu pozwala zamodelować wewnętrzną regulację w sieci genowo-białkowej, umożliwiającą utrzymanie właściwego poziomu białek i odpowiedź na bodźce zewnętrzne. Do podstawowego modelu produkcji białka zostały dodane dwa typy autoregulacji, w efekcie analizowane są modele:

- ze sprzężeniem dodatnim – białko indukuje aktywację genu (Rysunek 4.1A);
- ze sprzężeniem ujemnym – białko indukuje dezaktywację genu (Rysunek 4.1B).

Model produkcji białka bez autoregulacji ma stałą produkcję mRNA i nie zawiera przełączeń, dlatego nie będzie analizowany zaproponowanymi metodami układów kawałkami liniowych. Oba modele z autoregulacją zawierają po jednej wartości progowej θ_P, która dzieli układ na dwie domeny: o niskim oraz o wysokim poziomie białka. Domeny są oznaczane $\{0\}$ - domena poniżej wartości progowej oraz $\{1\}$ - domena powyżej wartości progowej. W domenie o wysokim poziomie białka aktywna jest regulacja stanu genu przez to białko, która polega na aktywacji lub dezaktywacji genu. Proces ten jest modelowany poprzez przełączenie wartości parametru. Przełączenia występują w modelu w postaci zmiennej przełączającej Z_P, której wartość zależy od stanu układu:

$$Z_P = \begin{cases} 0 & P < \theta_P \\ 1 & P \geqslant \theta_P. \end{cases} \tag{4.1}$$

Wszystkie trzy modele produkcji białka są złożone z dwóch liniowych równań różniczkowych. W modelu jawnie występują tylko mRNA (R) oraz białko (P), natomiast stan genu jest opisany przez wartość zmiennej przełączającej Z_P. Równanie opisujące zmianę poziomu mRNA składa się z dwóch członów: pierwszy opisuje produkcję mRNA, drugi – degradację:

$$\frac{d\,R(t)}{d\,t} = p^* - d_1 R(t). \tag{4.2}$$

Tempo produkcji mRNA –parametr $p*$, jest równy sumie tempa produkcji z obydwóch genów. W układzie bez autoregulacji tempo produkcji jest stałe, niezależne od stanu układu, stąd:

$$p^* = p. \tag{4.3}$$

W układach z autoregulacją, wartość parametru p^* zmienia się w zależności od stanu układu. W układzie ze sprzężeniem dodatnim jeden gen jest stale aktywny, a drugi gen jest aktywowany przy wysokim poziomie białka:

$$p^* = p_p + p_p Z_P, \tag{4.4}$$

gdzie p_p to tempo produkcji mRNA w układzie ze sprzężeniem dodatnim, a zmienna Z_P przyjmuje wartości 0 lub 1 w zależności od stanu układu. Natomiast w układzie ze sprzężeniem ujemnym obydwa geny są aktywne, gdy poziom białka jest niski. Wzrost poziomu białka powyżej wartości progowej powoduje wyłączenie jednego genu:

$$p^* = 2p_n - p_n Z_P. \tag{4.5}$$

p_n oznacza tempo produkcji mRNA z jednego genu dla modelu ze sprzężeniem ujemnym. Podobnie jak w przypadku równania opisującego zmiany poziomu mRNA, równanie opisujące zmiany poziomu białka $P(t)$ w czasie, składa się z członów odpowiadających za produkcję zależną od poziomu mRNA oraz degradację:

$$\frac{d\,P(t)}{d\,t} = p_2 R(t) - d_2 P(t). \tag{4.6}$$

Rozwój choroby często wiąże się z nadprodukcją białek (np. białka ostrej fazy), które kumulując się w organizmie mogą wywoływać pogorszenie się stanu zdrowia i aktywację dalszych ścieżek odpowiedzi na stres komórkowy. Jednym z elementów terapii jest obniżenie poziomów białek zapalnych poniżej zadanej wartości granicznej. W przedstawionym modelu założyłam, że celem terapii jest obniżenie poziomu białka poniżej zadanej wartości progowej. Cel terapeutyczny (P_{target}) został ustalony na poziomie 30 000 cząsteczek białka, co stanowi około 20% poziomu białka sprzed podania leku. W celu osiągnięcia celu terapeutycznego, do systemu wprowadzany jest lek, który zwiększa tempo degradacji białka i pozwala utrzymać jego poziom poniżej zadanej wartości granicznej. W celu zamodelowania tego procesu do modeli zostało dodane przełączenie zależne od czasu. Po czasie t_D układ zmienia swoją postać, a do równania opisującego poziom białka dodany jest człon opisujący degradację białka przez lek:

$$\frac{d\,P(t)}{d\,t} = p_2 R(t) - (d_2 + d_{2D}\,DRUG(t > t_D))P(t), \tag{4.7}$$

gdzie $DRUG$ to liczba cząsteczek leku, d_{2D} to tempo degradacji indukowanej przez lek, a t_D to chwila podania leku.

Tabela 4.1: Znaczenie i wartość parametrów modelu produkcji białka

Parametr	Opis	Wartość	Jednostka
p	tempo produkcji mRNA (bez autoregulacji)	0.06	1/s
p_p	tempo produkcji mRNA (sprz. dodatnie)	0.03	1/s
p_n	tempo produkcji mRNA (sprz. ujemne)	0.06	1/s
p_2	tempo produkcji białka	0.11	1/s
d_1	tempo degradacji mRNA	$2 \cdot 10^{-4}$	1/s
d_2	tempo degradacji białka	$2 \cdot 10^{-4}$	1/s
d_{2D}	tempo degradacji białka indukowanej przez lek	$1 \cdot 10^{-7}$	1/s
$DRUG$	liczba cząsteczek leku (bez autoregulacji)	$9 \cdot 10^3$	cząsteczki
	liczba cząsteczek leku (sprz. dodatnie)	$4.6 \cdot 10^3$	cząsteczki
	liczba cząsteczek leku (sprz. ujemne)	$2 \cdot 10^4$	cząsteczki
t_D	czas podania leku	15	godzina
P_{target}	docelowy poziom białka	$3 \cdot 10^4$	cząsteczki
θ_P	wartość progowa	$5 \cdot 10^4$	cząsteczek

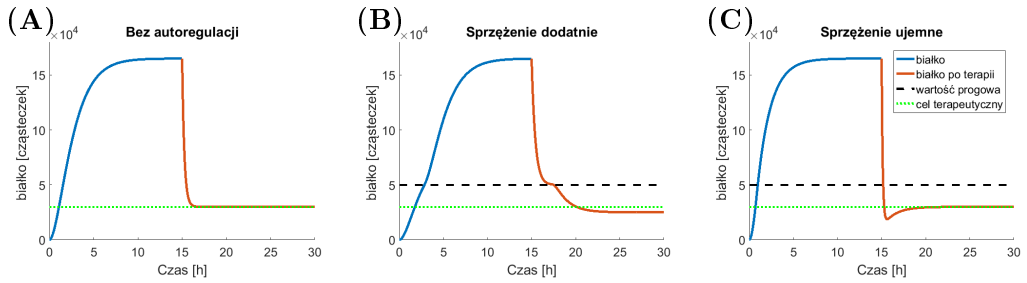
W obu modelach w stanie natywnym układ dąży do punktu stacjonarnego zlokalizowanego w domenie powyżej wartości progowej. Wartości parametrów produkcji mRNA (p, p_p i p_n) zostały dobrane tak, aby poziom białka przez podaniem leku we wszystkich układach był identyczny. W efekcie, można porównać wpływ terapii na poziom białka, w układach o różnych typach autoregulacji. Parametry zostały oznaczone małymi literami, a ich wartości są przedstawione w Tabeli 4.1.

Przebiegi czasowe

Dla zerowych warunków początkowych, w obu układach następuje stabilizacja poziomu białka na wysokim poziomie — w domenie powyżej wartości progowej. W układzie bez sprzężeń nie występuje wartość progowa, więc tempo produkcji mRNA jest stałe. Poziom białka stabilizuje się na 165 000 cząsteczek (Rysunek 4.2A). W układzie z sprzężeniem dodatnim widoczny jest wzrost tempa produkcji białka, wynikający z przekroczenia wartości progowej, aktywacji drugiego genu i wzrostu tempa produkcji mRNA (Rysunek 4.2B). W układzie ze sprzężeniem ujemnym, dynamika jest znacznie szybsza, a stabilizacja układu przed podaniem leku występuje wcześniej, niż w pozostałych układach (Rysunek 4.2C).

W 15. godzinie symulacji nastąpiło przełączenie - podanie leku, które gwałtownie zwiększa tempo degradacji białka. Dawka leku została dobrana indywidualnie do modelu, aby został osiągnięty cel terapeutyczny. W nowoczesnych terapiach, ze względu na toksyczność leków, dawki są dobierane tak, aby przy minimalnej szkodliwości dla organizmu osiągnąć założony cel terapeutyczny. W rozważanym przypadku dawka graniczna, czyli minimalna dawka pozwalająca osiągnąć cel terapeutyczny ($P_{target} = 30\,000$ cząsteczek), może być wyliczona ze wzoru (4.7). Wzór określający minimalną skuteczną dawkę jest zależny od typu modelu (który uwzględniony jest w parametrze p^*) i ma następującą formę:

$$DRUG_{effective} = \frac{p_2\, p^*}{d_1\, d_{2D}\, P_{target}} - \frac{d_2}{d_{2D}}. \tag{4.8}$$



Rysunek 4.2: Przebiegi czasowe poziomu białka w układzie (A) bez sprzężeń; (B) ze sprzężeniem dodatnim; (C) ze sprzężeniem ujemnym; (w chwili $t_D = 15h$ podano lek, który ma obniżyć poziom białka poniżej założonego celu terapeutycznego)

W układzie bez sprzężeń dawka graniczna wynosi 9 000 cząsteczek i powoduje obniżenie poziomu białka do 30 000 cząsteczek. W układzie ze sprzężeniem dodatnim graniczna dawka leku wynosi 4 600 cząsteczek, i powoduje stabilizację poziomu białka na wartości 25 000. Niższe dawki powodują stabilizację poziomu białka powyżej wartości docelowej — w domenie z dwoma aktywnymi genami. Natomiast w układzie ze sprzężeniem ujemnym, efektywna dawka leku jest znacznie większa i wynosi 20 000 cząsteczek. Dawka ta powoduje stabilizację poziomu białka na wartości 30 000 cząsteczek. Po podaniu leku odpowiedź układu jest bardzo szybka, a ponadto występuje przeregulowanie, charakterystyczne dla układów ze sprzężeniem ujemnym (Rysunek 4.2C).

4.2 Wykorzystanie rozwiązań analitycznych modeli

Podsystemy opisujące zachowanie układów przy niskim lub wysokim poziomie białka są zazwyczaj opisywane równaniami liniowymi, dlatego możliwe jest analityczne wyznaczenie rozwiązań czasowych. Rozwiązania czasowe pozwalają na dokładne wyliczenie liczby cząsteczek w danej chwili czasu, dla wybranych warunków początkowych. Ponadto rozwiązania czasowe mogą być wykorzystane w dalszej analizie układów z przełączeniami, do określenia punktów docelowych trajektorii, stworzenia grafu tranzycji oraz wyznaczenia zwyczajnych punktów stacjonarnych. Najpierw wyznaczam rozwiązanie czasowe układu w poszczególnych podsystemach, w których wartość p^* jest stała. Podsystemy są opisane tymi samymi równaniami różniczkowymi i różnią się jedynie wartościami parametru p^*, który zawiera informacje o domenie poprzez zmienną przełączającą Z_P. W zależności od układu p^* jest równy p (w układzie bez autoregulacji), jest opisany formułą (4.4) (sprzężenie dodatnie) lub formułą (4.5) (sprzężenie ujemne). W kolejnych punktach omówię problem wyznaczenia rozwiązania czasowego dla pełnego układu.

4.2.1 Rozwiązanie analityczne równania opisującego poziom mRNA

Równanie różniczkowe (4.2) opisujące poziom mRNA można rozwiązać przy wykorzystaniu transformacji, poprzez zdefiniowanie nowej zmiennej:

$$x(t) = R(t) - \frac{p^*}{d_1} \tag{4.9}$$

Pochodna po czasie zmiennej $x(t)$ jest równa pochodnej po czasie R:

$$\frac{dx(t)}{dt} = \frac{dR(t)}{dt}, \tag{4.10}$$

a zatem można wyznaczyć wartość pochodnej:

$$\frac{dx(t)}{dt} = p^* - d_1\left(x(t) + \frac{p^*}{d_1}\right) = -d_1 x(t). \tag{4.11}$$

Rozwiązanie powyższego równania jest stosunkowo proste i wykorzystuje się do niego metodę rozdzielenia zmiennych:

$$\frac{dx(t)}{x(t)} = -d_1 dt. \tag{4.12}$$

Po wykonaniu całkowania obu stron otrzymujemy:

$$\int_0^t \frac{dx(\tau)}{x(\tau)} d\tau = -d_1 \int_0^t d\tau, \tag{4.13}$$

$$\ln x(t) - \ln x(0) = -d_1 t, \tag{4.14}$$

$$\ln x(t) = \ln x(0) - d_1 t. \tag{4.15}$$

Zatem, rozwiązanie czasowe zmiennej $x(t)$ wynosi:

$$x(t) = x(0)e^{-d_1 t}. \tag{4.16}$$

Podstawiając równanie (4.16) do równania (4.9) i jednocześnie przyjmując, że $x(0) = R(0) - \frac{p^*}{d_1}$ otrzymuje się:

$$x(0)e^{-d_1 t} = R(t) - \tfrac{p^*}{d_1}, \tag{4.17}$$

$$\left(R(0) - \tfrac{p^*}{d_1}\right)e^{-d_1 t} = R(t) - \tfrac{p^*}{d_1}. \tag{4.18}$$

Rozwiązanie analityczne opisujące poziom mRNA jest zatem następujące:

$$R(t) = \frac{p^*}{d_1} + \left(R(0) - \frac{p^*}{d_1}\right)e^{-d_1 t}. \tag{4.19}$$

4.2.2 Rozwiązanie analityczne równania opisującego poziom białka

Rozwiązanie równania na poziom białka jest nieco bardziej skomplikowane, ze względu na konieczność rozwiązania niejednorodnego równania liniowego. Poniższe rozwiązanie wykorzystuje metodę uzmienniania stałych. Do równania różniczkowego (4.6) opisującego zmianę wartości P, można wstawić rozwiązanie czasowe (4.19) dla zmiennej R:

$$\frac{dP(t)}{dt} = p_2\left(\frac{p^*}{d_1} + Ce^{-d_1 t}\right) - d_2 P(t), \tag{4.20}$$

gdzie

$$C = R(0) - \frac{p^*}{d_1}. \tag{4.21}$$

Jest to równanie różniczkowe pierwszego rzędu i można je zapisać w postaci:

$$\frac{dP(t)}{dt} + d_2 P(t) = p_2\left(\frac{p^*}{d_1} + Ce^{-d_1 t}\right). \tag{4.22}$$

Pierwszym etapem rozwiązania równania jest rozwiązanie odpowiadającego mu równania jednorodnego, przez co otrzymuje się:

$$P(t) = C_1 e^{-d_2 t}. \tag{4.23}$$

Stosując metodę uzmienniania stałej zastępujemy C_1 przez $C_1(t)$,a następnie wykonujemy kolejne kroki.
Różniczkowanie funkcji opisanej równaniem (4.23):

$$\frac{dP(t)}{dt} = \frac{dC_1}{dt}e^{-d_2 t} - C_1 d_2 e^{-d_2 t}, \tag{4.24}$$

Podstawienie (4.23) oraz (4.24) do równania 4.22:

$$\frac{dC_1}{dt}e^{-d_2 t} - d_2 C_1 e^{-d_2 t} + d_2 C_1 e^{-d_2 t} = p_2\left(\frac{p^*}{d_1} + Ce^{-d_1 t}\right), \tag{4.25}$$

Zredukowanie wyrazów podobnych:

$$\frac{dC_1}{dt}e^{-d_2 t} = p_2\left(\frac{p^*}{d_1} + Ce^{-d_1 t}\right), \tag{4.26}$$

Zapisanie wzoru na pochodną C_1:

$$\frac{dC_1}{dt} = p_2\left(\frac{p^*}{d_1} + Ce^{-d_1 t}\right)e^{d_2 t}, \tag{4.27}$$

Wyliczenie funkcji C_1 poprzez całkowanie:

$$C_1(t) = \int_0^t p_2\left(\frac{p^*}{d_1} + Ce^{-d_1 t}\right)e^{d_2 t}d\tau, \tag{4.28}$$

$$C_1(t) = \int_0^t \frac{p_2 p^*}{d_1}e^{d_2 t}d\tau + \int_0^t p_2 C e^{(d_2-d_1)t}d\tau, \tag{4.29}$$

$$C_1(t) = \frac{p_2 p^*}{d_1 d_2}e^{d_2 t} + \frac{p_2 C}{d_2 - d_1}e^{(d_2-d_1)t} + C_2, \tag{4.30}$$

Specyficzny przypadek dla $d_1 = d_2$ zostanie omówiony w dalszej części rozprawy.
Wyznaczoną funkcję C_1 należy wstawić do równania 4.24:

$$P(t) = \left(\tfrac{p_2 p^*}{d_1 d_2}e^{d_2 t} + \tfrac{p_2 C}{d_2 - d_1}e^{(d_2-d_1)t} + C_2\right)e^{-d_2 t}, \tag{4.31}$$

$$P(t) = \tfrac{p_2 p^*}{d_1 d_2} + \tfrac{p_2 C}{d_2 - d_1}e^{-d_1 t} + C_2 e^{-d_2 t}, \tag{4.32}$$

Aby wyznaczyć funkcję C_2, należy znaleźć rozwiązanie szczególne dla $t = 0$:

$$P(0) = \frac{p_2 p^*}{d_1 d_2} + \frac{p_2 C}{d_2 - d_1} + C_2 \tag{4.33}$$

$$C_2 = P(0) - \frac{p_2 p^*}{d_1 d_2} - \frac{p_2 C}{d_2 - d_1}, \tag{4.34}$$

gdzie $C = R(0) - p^*/d_1$. Zatem:

$$C_2 = P(0) - \frac{p_2 p^*}{d_1 d_2} - \frac{p_2 (R(0) - p^*/d_1)}{d_2 - d_1}, \tag{4.35}$$

$$C_2 = P(0) - \frac{p_2 p^*}{d_1 d_2} - \frac{p_2 d_1 R(0) - p^* p_2}{d_1 (d_2 - d_1)}, \tag{4.36}$$

$$C_2 = P(0) - \frac{p_2 p^*}{d_1 d_2} - \frac{p_2 R(0)}{d_2 - d_1} + \frac{p^* p_2}{d_1 (d_2 - d_1)}, \tag{4.37}$$

$$C_2 = P(0) - \frac{p_2 R(0)}{d_2 - d_1} + \frac{p^* p_2}{d_2 (d_2 - d_1)}, \tag{4.38}$$

Po wykonaniu podstawień do równania (4.31):

$$P(t) = \frac{p_2 p^*}{d_1 d_2} + \frac{p_2 C}{d_2 - d_1} e^{-d_1 t} + \left(P(0) - \frac{p_2 R(0)}{d_2 - d_1} + \frac{p^* p_2}{d_2 (d_2 - d_1)} \right) e^{-d_2 t}, \tag{4.39}$$

$$P(t) = \frac{p_2 p^*}{d_1 d_2} + \frac{p_2 (R(0) - \frac{p^*}{d_1})}{d_2 - d_1} e^{-d_1 t} + \left(P(0) - \frac{p_2 R(0)}{d_2 - d_1} + \frac{p^* p_2}{d_2 (d_2 - d_1)} \right) e^{-d_2 t}, \tag{4.40}$$

otrzymuje się rozwiązanie $P(t)$

$$\begin{aligned} P(t) = {} & \frac{p_2 p^*}{d_1 d_2} + \left(\frac{p_2 R(0)}{d_2 - d_1} - \frac{p^* p_2}{d_1 (d_2 - d_1)}) \right) e^{-d_1 t} \\ & + \left(P(0) - \frac{p_2 R(0)}{d_2 - d_1} + \frac{p^* p_2}{d_2 (d_2 - d_1)} \right) e^{-d_2 t}. \end{aligned} \tag{4.41}$$

4.2.3 Wyliczenie czasu przełączenia

W celu wyliczenia czasu przełączenia (t_s) należy przyrównać równanie (4.41) do wartości progowej θ_P:

$$\begin{aligned} \theta_P &= \frac{p_2 p^*}{d_1 d_2} + \left(\frac{p_2 R(0)}{d_2 - d_1} - \frac{p^* p_2}{d_1 (d_2 - d_1)}) \right) e^{-d_1 t_s} \\ &+ \left(P(0) - \frac{p_2 R(0)}{d_2 - d_1} + \frac{p^* p_2}{d_2 (d_2 - d_1)} \right) e^{-d_2 t_s}. \end{aligned} \tag{4.42}$$

Ze względu na uwikłanie t_s w ogólnym przypadku wyznaczenie czasu przełączenia nie jest możliwe. Jednym ze szczególnych przypadków, gdy wyznaczenie czasu przełączenia jest stosunkowe proste, stanowi układ z wartościami parametrów $d_2 = 2d_1$. Dla takich wartości parametrów czasowe równanie poziomu białka jest następujące:

$$P(t) = \frac{p_2 p^*}{2 d_1^2} + \left(\frac{p_2 R(0)}{d_1} - \frac{p^* p_2}{d_1^2} \right) e^{-d_1 t} + \left(P(0) - \frac{p_2 R(0)}{d_1} + \frac{p^* p_2}{2 d_1^2} \right) e^{-2 d_1 t}. \tag{4.43}$$

Dzięki wprowadzeniu założenia, że $x = \exp(-d_1 t)$ równanie przyjmuje postać równania kwadratowego, którego rozwiązanie można znaleźć poprzez wyliczenie pierwiastków.

$$0 = \left(P(0) - \frac{p_2 R(0)}{d_1} + \frac{p^* p_2}{2d_1^2}\right)x^2 + \left(\frac{p_2 R(0)}{d_1} - \frac{p^* p_2}{d_1^2}\right)x + \frac{p_2 p^*}{2d_1^2} - \theta_P. \tag{4.44}$$

Równianie kwadratowe, w zależności od wartości parametrów, może mieć dwa, jedno lub zero rozwiązań,. Dzięki wyznaczeniu Δ (delty) równania kwadratowego, można wyznaczyć czas przełączenia w układzie, w którym trajektorie zmierzają do wartości progowej. W przypadku, gdy Δ jest równa 0:

$$\Delta = \left(\frac{p_2 R(0)}{d_1} - \frac{p^* p_2}{d_1^2}\right)^2 - 4\left(P(0) - \frac{p_2 R(0)}{d_1} + \frac{p^* p_2}{2d_1^2}\right)\left(\frac{p_2 p^*}{2d_1^2} - \theta_P\right) = 0, \tag{4.45}$$

istnieje tylko jeden możliwy czas przełączenia, równy:

$$t_s = \frac{1}{d_1} ln\left(\frac{-2R(0)d_1 p_2 + p^* p_2}{2(P(0)d_1^2 - P(0)d_1 p_2 + p^* p_2)}\right). \tag{4.46}$$

Natomiast jeśli Δ jest dodatnia, czas przełączenia to czas o mniejszej dodatniej wartości:

$$t_{s_1} = \frac{1}{d_1} ln\left(\frac{-2R(0)d_1 p_2 + p^* p_2 - d_1^2\sqrt{\Delta}}{2(P(0)d_1^2 - P(0)d_1 p_2 + p^* p_2)}\right), \tag{4.47}$$

$$t_{s_2} = \frac{1}{d_1} ln\left(\frac{-2R(0)d_1 p_2 + p^* p_2 + d_1^2\sqrt{\Delta}}{2(P(0)d_1^2 - P(0)d_1 p_2 + p^* p_2)}\right). \tag{4.48}$$

Jeśli wartości t_s są ujemne, to trajektoria startująca z danego punktu początkowego (R_0, P_0) nigdy nie osiągnie wartości granicznej. Natomiast, jeśli Δ jest ujemna, to czasy są urojone, więc trajektoria nie dojdzie do granicy i zostanie w domenie. Jak pokazałam powyżej, dla pewnych, specyficznych zbiorów parametrów, wyliczenie czasu przełączenia jest możliwe. Jednakże w większości przypadków analityczne wyznaczenie czasu przełączenia jest niemożliwe. W celu wyznaczenia jego przybliżonej wartości, można zastosować metody numeryczne lub wprowadzić pewne założenia, które pozwolą na wyliczenie przybliżonego czasu przełączenia.

4.2.4 Rozwiązanie analityczne równania opisującego poziom białka dla wybranych parametrów

W rozważanych modelach parametry degradacji d_1 oraz d_2 mają tą samą wartość, co należy uwzględnić podczas wyznaczania funkcji czasowej białka $P(t)$. Równanie różniczkowe opisujące zmianę poziomu białka ma formę:

$$\frac{dP(t)}{dt} = p_2\left(\frac{p^*}{d_1} + Ce^{-d_1 t}\right) - d_1 P(t), \tag{4.49}$$

gdzie

$$C = R(0) - \frac{p^*}{d_1}, \tag{4.50}$$

zatem rozwiązanie równania jednorodnego jest następujące:

$$P(t) = C_1 e^{-d_1 t}. \tag{4.51}$$

Po różniczkowaniu powyższej funkcji oraz podstawieniu do równania (4.49) otrzymuje się:

$$\frac{dC_1(t)}{dt} e^{-d_1 t} = p_2 \left(\frac{p^*}{d_1} + C e^{-d_1 t} \right), \tag{4.52}$$

co prowadzi do równania:

$$\frac{dC_1(t)}{dt} = \frac{p^* p_2}{d_1} e^{d_1 t} + p_2 C, \tag{4.53}$$

z którego można wyznaczyć wartość C_1 poprzez całkowanie:

$$C_1(t) = \int_0^t \frac{p^* p_2}{d_1} e^{d_1 t} d\tau + \int_0^t p_2 C d\tau. \tag{4.54}$$

Funkcja zależna od czasu opisująca wartość C_1 jest następująca:

$$C_1(t) = \frac{p^* p_2}{d_1^2} e^{d_1 t} + p_2 C t + C_2. \tag{4.55}$$

Zatem poziom białka $P(t)$, uwzględniając podstawienia C_1 i C_2, w tym konkretnym przypadku jest opisany funkcją:

$$\begin{aligned} P(t) &= (\frac{p^* p_2}{d_1^2} e^{d_1 t} + p_2 C t + C_2) e^{-d_1 t} = \\ &= \frac{p^* p_2}{d_1^2} + p_2 C t e^{-d_1 t} + C_2 e^{-d_1 t}. \end{aligned} \tag{4.56}$$

Gdzie wartość parametru C_2 wynika z warunków początkowych, czyli:

$$P(0) = \tfrac{p_2 p^*}{d_1^2} + C_2, \tag{4.57}$$

$$C_2 = P(0) - \tfrac{p_2 p^*}{d_1^2}. \tag{4.58}$$

Zatem, po podstawieniu równania (4.50) i równania (4.58) do równania (4.56) pełna forma równania na $P(t)$ jest następująca:

$$P(t) = \frac{p^* p_2}{d_1^2} + p_2 \left(R(0) - \frac{p^*}{d_1} \right) t e^{-d_1 t} + (P(0) - \frac{p_2 p^*}{d_1^2}) e^{-d_1 t}. \tag{4.59}$$

Ze względu na złożoną formę równania (człon $xte^{-d_1 t} + ye^{-d_1 t}$), nie jest możliwe wyznaczenie analitycznie czasu przełączenia.

4.2.5 Wyliczenie punktów docelowych

Rozwiązania analityczne dla poszczególnych domen można wykorzystać do wyznaczenia punktów docelowych, poprzez zastosowanie twierdzenia granicznego. Z równania 4.2 przy założeniu $t \to \infty$ wynika liczba cząsteczek R w punkcie stacjonarnym:

$$\lim_{t \to \infty} R(t) = R_s = \frac{p*}{d_1}, \tag{4.60}$$

Natomiast z równania (4.6) przy założeniu, że w układzie nie jest podawany lek oraz przy założeniu $t \to \infty$ można wyliczyć liczbę P:

$$\lim_{t\to\infty} P(t) = P_s = \frac{p^* p_2}{d_1 d_2}, \tag{4.61}$$

W układzie po podaniu leku zmienia się tempo degradacji białka (równanie (4.7)) zatem, w czasie dążącym do nieskończoności, poziom białka w punkcie docelowym jest opisany równaniem:

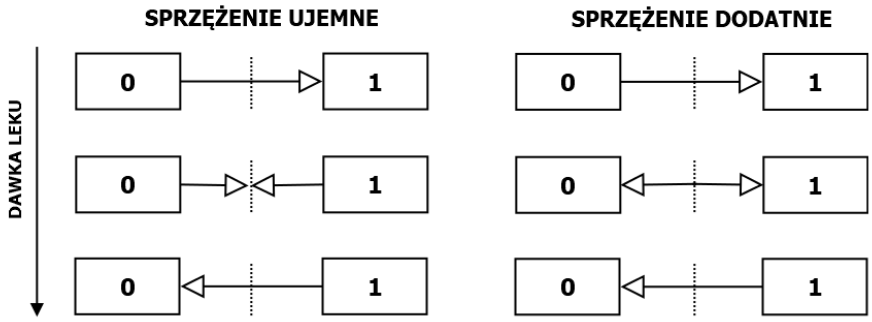
$$\lim_{t\to\infty} P(t) = P_s = \frac{p^* p_2}{d_1 (d_2 + d_{2D} DRUG)}. \tag{4.62}$$

4.3 Zastosowanie grafu tranzycji do analizy układu produkcji białka

Do schematycznego opisu zachowania układów ze sprzężeniem ujemnym oraz dodatnim, przy różnych dawkach leku można wykorzystać grafy tranzycji. Grafy przedstawiają kierunek przejścia trajektorii między układami, w zależności od poziomu początkowego zmiennej P, przy założeniu, że lek jest podawany w chwili $t_D = 0h$. Graf dla przedstawionych układów z autoregulacją składa się jedynie z dwóch domen (węzłów), ze względu na istnienie jednej wartości progowej. Kierunek przejścia pomiędzy domenami zmienia się wraz ze wzrostem dawki leku, a zróżnicowanie dynamiki widoczne jest w postaci różnic w grafach (Rysunek 4.3). Zarówno w układzie ze sprzężeniem ujemnym, jak i dodatnim, jeśli dawka leku jest niska (lub równa 0), to trajektorie przechodzą z domeny o niskim poziomie białka $\{0\}$ do domeny o wysokim poziomie białka $\{1\}$ (Rysunek 4.3 pierwszy wiersz oraz Rysunek 4.2 czas $t < 15h$). Celem podania leku jest obniżenie poziomu białka poniżej celu terapeutycznego, co wiąże się ze zmierzaniem trajektorii do domeny poniżej wartości progowej. W przypadku układu ze sprzężeniem ujemnym, dla średnich dawek leku trajektorie obu układów są skierowane w stronę wartości progowej (Rysunek 4.3 drugi wiersz, pierwsza kolumna), co wiąże się z występowaniem czarnej ściany w układzie. Z kolei w układzie ze sprzężeniem dodatnim, trajektorie w obu domenach są skierowane w kierunku przeciwnym do wartości progowej (Rysunek 4.3 drugi wiersz, druga kolumna), co oznacza, że w układzie występuje biała ściana. Zastosowanie dużej dawki leku powoduje przejście wszystkich trajektorii do domeny poniżej wartości progowej $\{0\}$ (Rysunek 4.3 trzeci wiersz). Należy mieć na uwadze, że dawka leku, która powoduje zmianę zachowania układu, a zarazem zmianę grafu, jest znacznie niższa w modelu ze sprzężeniu dodatnim, niż w modelu ze sprzężeniem ujemnym.

4.4 Analiza punktów stacjonarnych w modelach produkcji białka

Wyznaczenie punktów stacjonarnych, zarówno zwyczajnych (RSP), jak i osobliwych (SSP), dla stworzonych modeli produkcji białka jest stosunkowo proste i niesie informacje o możliwych typach odpowiedzi. Możliwe jest również wyznaczenie zakresów parametrów, dla jakich obserwuje się określone zachowanie w systemie. Analiza wykonana w niniejszym rozdziale bazuje na metodologii opisanej w sekcji 3.3.



Rysunek 4.3: Graf tranzycji dla modeli produkcji białka ze sprzężeniem ujemnym oraz dodatnim w zależności od dawki leku ($t_D = 0h$) ($\{0\}$ – domena poniżej wartości progowej; $\{1\}$ – domena powyżej wartości progowej; przerywane linie – granice między domenami)

4.4.1 Zwyczajne punkty stacjonarne

Ze względu na istnienie wartości progowej θ tylko dla zmiennej P, oznaczającej białko, by określić istnienie punktu RSP, należy wyliczyć wyłącznie wartość tej zmiennej w obu domenach, w stanie równowagi (wykorzystując równanie 4.61 oraz 4.62) i porównać go z wartością progową θ_P.

Sprzężenie dodatnie

W modelu ze sprzężeniem dodatnim występowanie punktów RSP jest określone następującymi warunkami.

W domenie poniżej wartości progowej: parametr $p^* = p_p$, zatem punkt stacjonarny jest opisany równaniem:

$$\text{układ natywny}: \quad P_s = \frac{p_p p_2}{d_1 d_2}, \tag{4.63}$$

$$\text{po podaniu leku}: \quad P_s = \frac{p_p p_2}{d_1(d_2 + d_{2D} DRUG)}. \tag{4.64}$$

Zwyczajny punkt stacjonarny będzie występował w tej domenie jeśli wartość P_s będzie mniejsza od wartości progowej. Warunek na występowanie RSP jest następujący:

$$\text{układ natywny}: \quad \frac{p_p p_2}{d_1 d_2} < \theta_P, \tag{4.65}$$

$$\text{po podaniu leku}: \quad \frac{p_p p_2}{d_1(d_2 + d_{2D} DRUG)} < \theta_P, \tag{4.66}$$

W domenie powyżej wartości progowej: parametr $p^* = 2p_p$, punkt stacjonarny jest opisany równaniem:

$$\text{układ natywny}: \quad P_s = \frac{2p_p p_2}{d_1 d_2}, \tag{4.67}$$

$$\text{po podaniu leku}: \quad P_s = \frac{2p_p p_2}{d_1(d_2 + d_{2D} DRUG)}. \tag{4.68}$$

Poziom białka w czasie $t \to \infty$ musi być większy od wartości progowej, zatem warunek na występowanie RSP w tej domenie jest następujący:

$$\text{układ natywny}: \quad \frac{2p_p p_2}{d_1 d_2} > \theta_P, \tag{4.69}$$

$$\text{po podaniu leku}: \quad \frac{2p_p p_2}{d_1(d_2 + d_{2D} DRUG)} > \theta_P. \tag{4.70}$$

Na podstawie powyższych warunków można zauważyć, że w układzie zawsze występuje co najmniej jeden punkt RSP. Dwa punkty RSP istnieją dla zakresu parametrów:

$$\text{układ natywny}: \quad \frac{1}{2}\theta_P < \frac{p_p p_2}{d_1 d_2} < \theta, \tag{4.71}$$

$$\text{po podaniu leku}: \quad \frac{1}{2}\theta_P < \frac{p_p p_2}{d_1(d_2 + d_{2D} DRUG)} < \theta_P. \tag{4.72}$$

Dla parametrów podanych w Tabeli 4.1, w układzie występuje jeden punkt stacjonarny w domenie powyżej wartości progowej, a jego lokalizacja jest następująca:

$$R_s = 300; P_s = 16.5 \cdot 10^4. \tag{4.73}$$

Natomiast po podaniu leku w dawce granicznej, punkt RSP występuje w domenie poniżej wartości progowej i ma lokalizację:

$$R_s = 150; P_s = 2.5 \cdot 10^4. \tag{4.74}$$

Sprzężenie ujemne

W modelu ze sprzężeniem ujemnym można również wyznaczyć zakresy parametrów, dla których występują punkty RSP.

W domenie poniżej wartości progowej: parametr $p^* = 2p_n$, punkt stacjonarny jest opisany równaniem:

$$\text{układ natywny}: \quad P_s = \frac{2p_n p_2}{d_1 d_2}, \tag{4.75}$$

$$\text{po podaniu leku}: \quad P_s = \frac{2p_n p_2}{d_1(d_2 + d_{2D} DRUG)}. \tag{4.76}$$

Występowanie RSP jest uwarunkowane położeniem punktu P_s poniżej wartości progowej:

$$\text{układ natywny}: \quad \frac{2p_n p_2}{d_1 d_2} < \theta_P, \tag{4.77}$$

$$\text{po podaniu leku}: \quad \frac{2p_n p_2}{d_1(d_2 + d_{2D} DRUG)} < \theta_P. \tag{4.78}$$

W domenie powyżej wartości progowej: parametr $p^* = p_n$, zatem punkt stacjonarny jest opisany równaniem:

$$\text{układ natywny}: \quad P_s = \frac{p_n p_2}{d_1 d_2}, \tag{4.79}$$

$$\text{po podaniu leku}: \quad P_s = \frac{p_n p_2}{d_1(d_2 + d_{2D} DRUG)}. \tag{4.80}$$

Warunkiem występowania RSP jest położenie punktu P_s powyżej wartości progowej:

$$\text{układ natywny}: \quad \frac{p_n p_2}{d_1 d_2} > \theta_P, \tag{4.81}$$

$$\text{po podaniu leku}: \quad \frac{p_n p_2}{d_1(d_2 + d_{2D} DRUG)} > \theta_P. \tag{4.82}$$

W układzie może występować maksymalnie 1 punkt RSP, a dla zakresu parametrów spełniających warunek:

$$\text{układ natywny}: \quad \frac{1}{2}\theta_P < \frac{p_n p_2}{d_1 d_2} < \theta_P, \tag{4.83}$$

$$\text{po podaniu leku}: \quad \frac{1}{2}\theta_P < \frac{p_n p_2}{d_1(d_2 + d_{2D} DRUG)} < \theta_P, \tag{4.84}$$

w systemie nie występuje żaden zwyczajny punkt stacjonarny (mogą jednak występować punkty SSP, co zostanie pokazane w następnym kroku analizy). Dla parametrów zamieszonych w Tabeli 4.1, przed podaniem leku, punkt stacjonarny występuje w domenie powyżej wartości progowej, a jego lokalizacja jest następująca:

$$R_s = 300; P_s = 16.5 \cdot 10^4. \tag{4.85}$$

Po podaniu leku punkt stacjonarny występuje w domenie poniżej wartości progowej:

$$R_s = 600; P_s = 3 \cdot 10^4. \tag{4.86}$$

4.4.2 Osobliwe punkty stacjonarne

Na podstawie algorytmu wyznaczania osobliwych punktów stacjonarnych (podpunkt 3.3.3), sprawdziłam możliwość ich występowania i stabilność w badanych układach. Pierwszym krokiem jest wyznaczenie Δ-regionów, w których mogą występować punkty SSP. Ze względu na występowanie w modelu produkcji białka na podstawie mRNA, w celu wyznaczenia Δ-regionów, należy zastosować zaproponowaną przeze mnie metodę łączącą informacje z macierzy Jacobiego i macierzy logoid-Jacobiego. Wektor zmiennych przełączających, w tym przypadku jest następujący:

$$\mathbf{Z} = [Z_R; Z_P], \tag{4.87}$$

przy czym zmienna Z_R nie występuje w układzie, ale jest uwzględniona w wektorze, aby zachować jego odpowiedni wymiar. Ujawniając zmienne przełączające w równaniach (4.2) i (4.7) otrzymujemy układ ze sprzężeniem dodatnim

$$\frac{d\,R(t)}{d\,t} = p_p + p_p Z_P - d_1 R(t), \tag{4.88}$$

$$\frac{d\,P(t)}{d\,t} = p_2 R(t) - (d_2 + d_{2D} DRUG) P(t), \tag{4.89}$$

oraz układ ze sprzężeniem ujemnym

$$\frac{d\,R(t)}{d\,t} = 2p_n - p_n Z_P - d_1 R(t), \tag{4.90}$$

$$\frac{d\,P(t)}{d\,t} = p_2 R(t) - (d_2 + d_{2D} DRUG) P(t). \tag{4.91}$$

Aby otrzymać równania modelu przed podaniem leku, należy przyjąć wartość parametru $DRUG = 0$ cząst. Zatem macierz logoid-Jacobiego w układzie ze sprzężeniem dodatnim jest równa:

$$\mathbf{L}_{pos} = \begin{bmatrix} 0 & p_p \\ 0 & 0 \end{bmatrix}, \tag{4.92}$$

a w układzie ze sprzężeniem ujemnym:

$$\mathbf{L}_{neg} = \begin{bmatrix} 0 & -p_n \\ 0 & 0 \end{bmatrix}. \tag{4.93}$$

W obydwóch przypadkach wyznacznik jest równy 0. Również wartości pochodnych $\partial R/\partial Z_R$ i $\partial P/\partial Z_P$ są równe 0 (wartości w elementów macierzy na przekątnej), co informuje o braku czarnych ścian w układzie. Macierz Jacobiego dla obydwóch układów jest następująca:

$$\mathbf{J} = \begin{bmatrix} -d_1 & 0 \\ p_2 & -d_2 \end{bmatrix}. \tag{4.94}$$

Schematyczna macierz łączona dla układu ze sprzężeniem dodatnim jest następująca:

$$\mathbf{JL}_{pos} = \begin{bmatrix} -j_{11} & l_{12} \\ j_{21} & -j_{22} \end{bmatrix}. \tag{4.95}$$

Zmienna R wpływa dodatnio na P (element j_{21}), a zmienna P również dodatnio wpływa na R (element l_{12}). Dodatnie wartości świadczą o uciekaniu trajektorii od progu, zatem w układzie nie może występować punkt SSP. Natomiast dla układu ze sprzężeniem ujemnym macierz łączona ma postać:

$$\mathbf{JL}_{neg} = \begin{bmatrix} -j_{11} & -l_{12} \\ j_{21} & -j_{22} \end{bmatrix} \tag{4.96}$$

i występuje w niej zamknięta sekwencja zależności między zmiennymi: R powoduje wzrost poziomu P (element j_{21}), a P powoduje spadek poziomu R (element $-l_{22}$). Ze względu na ujemną wartość jednego z elementów w macierzy, w układzie może występować osobliwy punkt stacjonarny.

Ponieważ w układzie ze sprzężeniem ujemnym może występować punkt SSP, następnym krokiem analizy jest wyznaczenie wartości zmiennej przełączającej Z_P. Następnie należy sprawdzić, czy istnieje zakres wartości parametrów, dla jakich wartość zmiennej przełączającej $Z_P \in [0, 1]$. Wartość Z_P można wyznaczyć z układu równań:

$$0 = 2p_n - p_n Z_P - d_1 R_s, \tag{4.97}$$

$$0 = p_2 R_s - (d_2 + d_{2D} DRUG)\theta_P. \tag{4.98}$$

Zatem

$$R_s = \frac{(d_2 + d_{2D}DRUG)\theta_P}{p_2}, \tag{4.99}$$

a wartość Z_P wynosi:

$$Z_P = 2 - \frac{d_1(d_2 + d_{2D}DRUG)\theta_P}{p_n p_2}. \tag{4.100}$$

W układzie występuje punkt SSP, jeśli spełniony jest warunek:

$$0 < 2 - \frac{d_1(d_2 + d_{2D}DRUG)\theta_P}{p_n p_2} < 1. \tag{4.101}$$

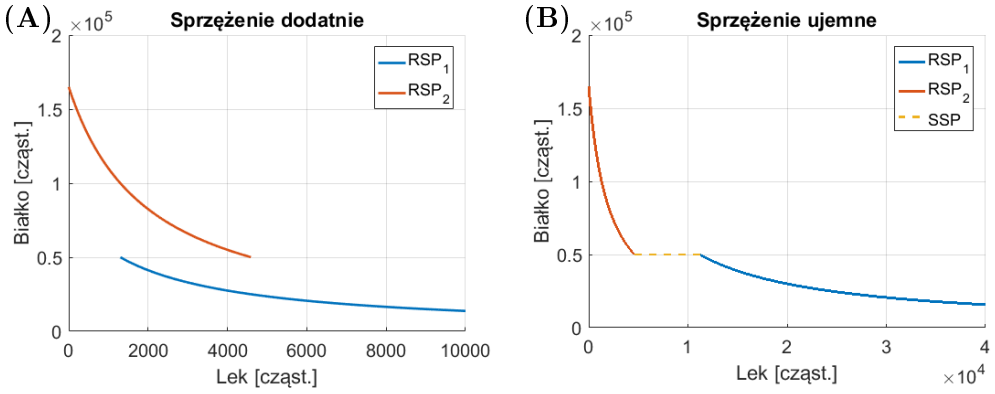
Niestety ze względu na występowanie w modelu produkcji białka na podstawie mRNA, macierz logoid-Jacobiego nie uwzględnia wszystkich zależności występujących w modelu. Z tego powodu, nie można wnioskować o stabilności punktu SSP na podstawie wartości własnych macierzy logoid-Jacobiego.

Dla parametrów podanych w Tabeli 4.1, w układzie przed podaniem leku wartość $Z_P = 1.697$, natomiast po podaniu leku $Z_P = -1.33$ co oznacza, że w powyższych warunkach w układzie nie występuje punkt SSP.

4.4.3 Analiza bifurkacyjna

W poprzednim podrozdziale przedstawione zostały warunki, jakie muszą być spełnione, aby w rozważanych układach występowały różne punkty stacjonarne. Nawet w bardzo prostym układzie przełączenia wartości parametrów pozwalają na uzyskanie skomplikowanej dynamiki. Wykonanie analizy bifurkacyjnej pozwala zbadanie zmian dynamiki układu w zależności od wartości parametrów. Jako parametr bifurkacyjny wybrałam parametr $DRUG$, ponieważ wpływa on bezpośrednio na tempo degradacji białka, a ponadto oznacza on liczbę cząsteczek leku, co pozwala na zbadanie odpowiedzi układu w zależności od zastosowanej dawki leku. Analiza bifurkacyjna badanych modeli wykazuje zmianę zachowania układu wraz ze wzrostem tempa degradacji białka Do stworzenia wykresów bifurkacyjnych można wykorzystać równania opisujące punkty stacjonarne oraz warunki ich występowania wyprowadzone w poprzednim rozdziale.

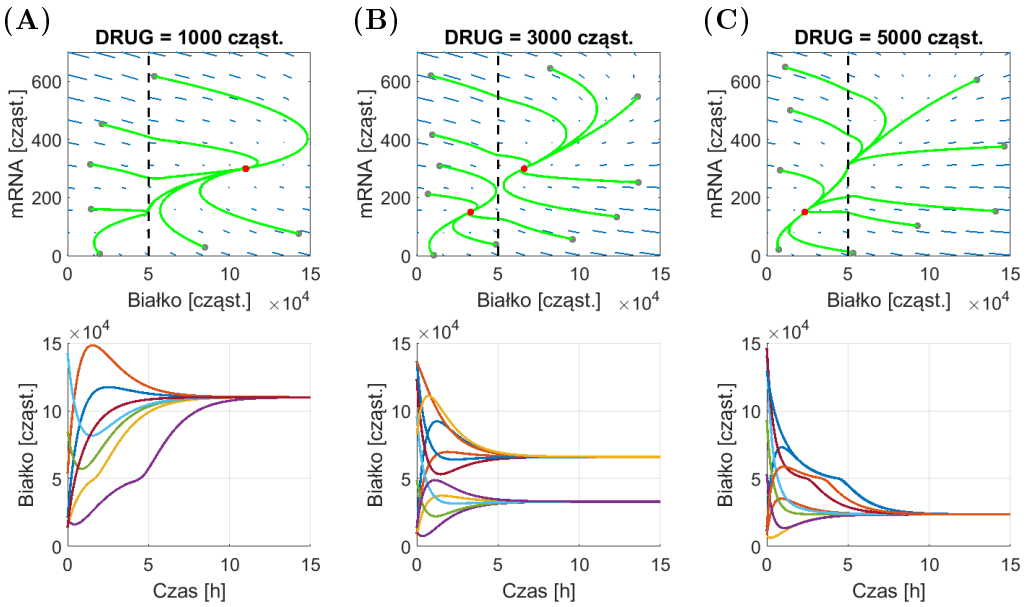
W zależności od dawki leku w badanych układach występuje zmiana rodzaju lub liczby punktów stacjonarnych. Wraz ze wzrostem dawki leku poziom białka obniża się. W układzie ze sprzężeniem dodatnim dla niskich dawek leku zwyczajny punkt równowagi jest w domenie powyżej wartości progowej. W zakresie dawki leku $DRUG \in [1300, 4599]$ cząst. w układzie znajdują się dwa punkty równowagi. Powyżej 4599 cząsteczek leku, w układzie jest jeden punkt równowagi, w domenie poniżej wartości progowej (Rysunek 4.4A). Model ze sprzężeniem ujemnym jest znacznie mniej wrażliwy na lek. W układzie tym, przy podaniu leku $DRUG \in [4\,590, 11\,200]$ cząst. nie występują punkty RSP, ale występuje jeden punkt SSP (Rysunek 4.4B, przerywana linia). Poniżej tego zakresu punkt RSP występuje w domenie powyżej wartości progowej ($\theta_P = 50\,000$ cząst.), a powyżej tego zakresu punkt RSP znajduje się w domenie poniżej wartości progowej. W układzie ze sprzężeniem ujemnym, aby obniżyć poziom białka w domenie poniżej wartości progowej w podobnym zakresie, jak w modelu ze sprzężeniem dodatnim, konieczne jest zastosowanie większych dawek leku (Rysunek 4.4B). Z tego powodu dawka leku, która w jednym z modeli jest uznawana za wysoką, w drugim jest uznawana za średnią.



Rysunek 4.4: Wykresy bifurkacyjne liczby, położenia i rodzajów punktów stacjonarnych w zależności od dawki leku; (A) Model ze sprzężeniem dodatnim; (B) Model ze sprzężeniem ujemnym

Na podstawie wykresów bifurkacyjnych do dalszej analizy wybrałam trzy różne dawki dla modelu ze sprzężeniem dodatnim i ujemnym, które, ze względu na obecność różnych typów i liczby punktów stacjonarnych, wywołują różne zachowanie układu. W układzie ze sprzężeniem dodatnim podanie małej dawki leku (np. 1 000 cząsteczek) powoduje jedynie obniżenie poziomu białka w punkcie równowagi RSP w stosunku do układu bez podania leku, ale punkt ten nadal pozostaje w domenie powyżej wartości progowej. Niezależnie od wartości początkowych, wszystkie trajektorie w układzie zmierzają do punku stacjonarnego RSP, w którym poziom białka wynosi 110 000 cząsteczek (Rysunek 4.5A). Przy większej dawce leku — równej np. 3 000 cząsteczek — w układzie istnieją dwa punkty RSP. W zależności od warunków początkowych, trajektorie zmierzają do punktu stacjonarnego w domenie powyżej albo poniżej wartości progowej (Rysunek 4.5B). Dla dużych dawek leku (np. 5 000 cząsteczek) w układzie występuje tylko punkt równowagi, w domenie poniżej wartości progowej, wszystkie trajektorie zmierzają do punktu z niskim poziomem białka (Rysunek 4.5C).

Następnie zbadałam, dawki leku, wywołujące powstanie różnych punktów stacjonarnych w układzie ze sprzężeniem ujemnym. Niska dawka leku (np. 1 000 cząsteczek) wywołuje obniżenie poziomu białka do 11 000 cząsteczek, tak samo jak w modelu ze sprzężeniem dodatnim. Również w tym układzie istnieje jeden zwyczajny punkt równowagi, w domenie powyżej wartości progowej (Rysunek 4.6A). Przy średniej dawce leku — np. 5 000 cząsteczek— w układzie nie występuje żaden zwyczajny punkt stacjonarny, za to istnieje jeden osobliwy punkt stacjonarny. W przebiegach czasowych obserwuje się oscylacje poziomu białka wokół wartości granicznej (Rysunek 4.6B). Dawka 5 000 cząsteczek leku w modelu ze sprzężeniem dodatnim, skutkowała obniżeniem poziom białka do 23 571 cząsteczek, co pozwalało na osiągnięcie celu terapeutycznego. W modelu ze sprzężeniem ujemnym, aby uzyskać tak niski poziom białka, konieczne jest podanie leku w dawce 26 000 cząsteczek. W układzie ze sprzężeniem ujemnym w domenie poniżej wartości progowej oba geny są aktywne, dlatego poziom mRNA jest wysoki (Rysunek 4.6C), natomiast w domenie ze sprzężeniem dodatnim przy niskim poziomie białka, tylko jeden gen jest aktywny, dlatego poziom mRNA jest znacznie niższy (Rysunek 4.5C).

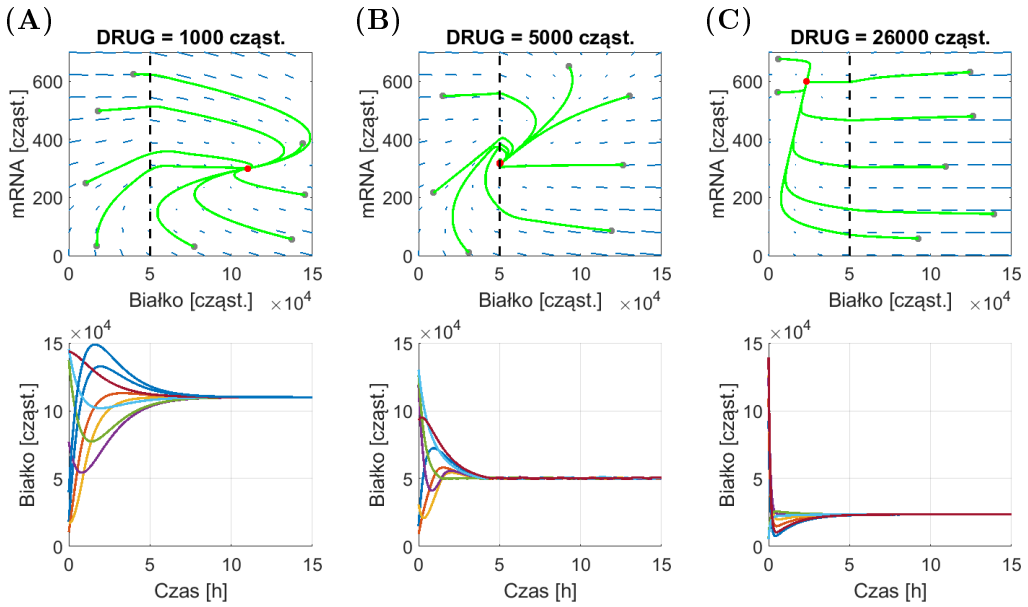


Rysunek 4.5: Odpowiedź układu z sprzężeniem dodatnim na różne dawki leku; (A) Niska dawka ($DRUG = 1000$ cząsteczek); (B) Średnia dawka ($DRUG = 3000$ cząsteczek); (C) Wysoka dawka ($DRUG = 5000$ cząsteczek) (Pierwszy rząd przedstawia przestrzeń fazową układu oraz przykładowe trajektorie dla różnych wartości początkowych, szara kropka - warunek początkowy, czerwona kropka - stan końcowy. Drugi rząd przedstawia przebiegi czasowe poziomu białka przy różnych wartościach początkowych)

4.5 Heterogeniczność populacji komórkowej wynikająca ze zróżnicowania progu aktywacji genów

Wprowadzenie stochastyczności do matematycznych modeli układów biologicznych pozwala na analizę odpowiedzi heterogenicznej populacji komórkowej. W niniejszym rozdziale rozpatrzę zróżnicowanie populacji wynikające z różnej wrażliwości na czynniki regulatorowe, odpowiedzialne za aktywację lub dezaktywację genu. Zjawisko to może być modelowane poprzez losowy wybór wartości progowej, gdzie jej obniżenie odpowiada zwiększonej wrażliwości na czynniki regulatorowe, z kolei zwiększenie – obniżonej wrażliwości. W analizowanym modelu produkcji białka występuje tylko jedna wartość progowa, zatem wprowadzenie heterogeniczności populacji polega na zrandomizowaniu położenia tylko tego jednego progu θ_P. Zmiana wartości progowej może powodować zmianę odpowiedzi układu, ponieważ niektóre trajektorie, które przecinały próg, mogą teraz do niego nie dochodzić, a inne, które nie dochodziły, teraz mogą go przecinać. Występowanie i położenie punktów RSP i SSP w układzie jest uzależnione od wartości progowych, zatem zmiana ich wartości może powodować zmianę odpowiedzi układu, względem odpowiedzi układu natywnego.

W pierwszym etapie eksperymentu zbadałam, jak na odpowiedź układów wpływa zróżnicowanie wartości progowej θ_P. Aby uzyskać pewien margines przy osiągnięciu celu terapeutycznego, wybrałam dawki wyższe niż wyliczone minimalne dawki skuteczne (w podrozdziale 4.1). W modelu ze sprzężeniem dodatnim zastosowałam dawkę leku 4 800 cząsteczek, a w modelu ze sprzężeniem ujemnym – 26 000 cząsteczek.



Rysunek 4.6: Odpowiedź układu z sprzężeniem ujemnym na różne dawki leku; (A) Niska dawka ($DRUG = 1000$ cząsteczek); (B) Średnia dawka ($DRUG = 5000$ cząsteczek); (C) Wysoka dawka ($DRUG = 26000$ cząsteczek) (Pierwszy rząd przedstawia przestrzeń fazową układu oraz przykładowe trajektorie dla różnych wartościach początkowych, szara kropka - warunek początkowe, czerwona kropka - stan końcowy. Drugi rząd przedstawia przebiegi czasowe białka przy różnych wartościach początkowych)

W kolejnym etapie zbadałam wpływ podania leku w losowych chwilach czasu na osiągalność celu terapeutycznego. W podstawowym modelu podanie leku, a co za tym idzie przełączenie parametru $DRUG$, następuje w chwili $t_D = 15h$ od rozpoczęcia symulacji. Wprowadzenie zróżnicowania czasu podania leku, wpływa na poziom białka w chwili przełączenia, ponieważ wcześniejsze podanie leku może nastąpić w chwili, gdy poziom białka nie osiągnie stanu stacjonarnego. Symulacje takie pozwalają modelować zachowanie populacji, w której komórki mają zróżnicowany poziom białka przed podaniem leku.

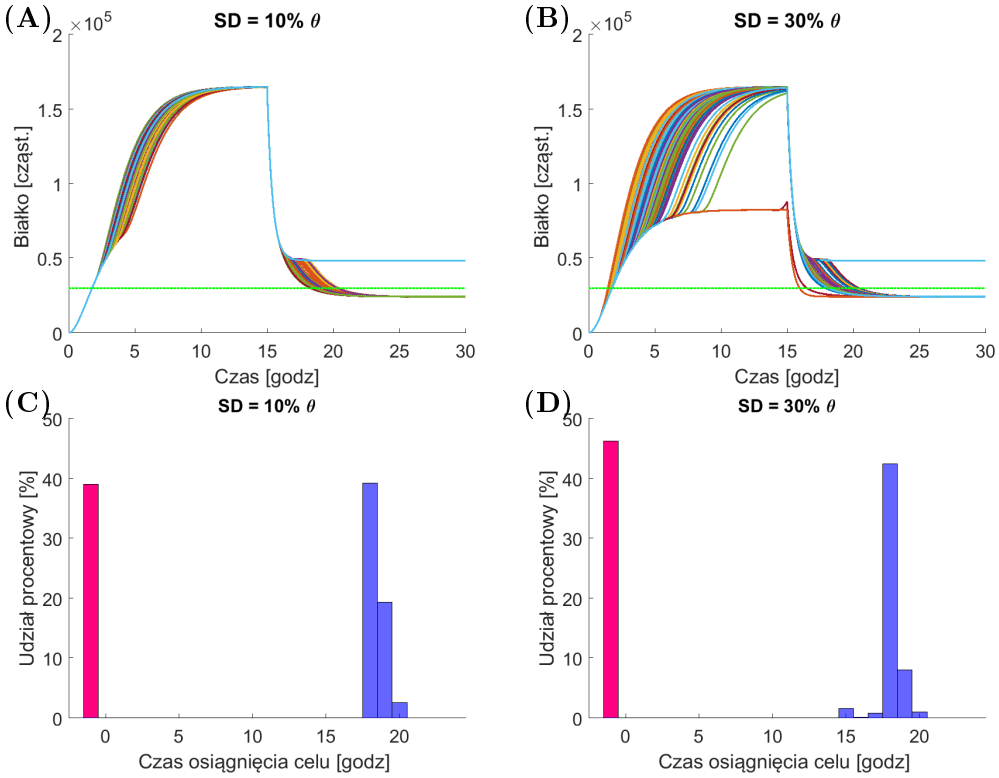
Następnie przeanalizowałam układ eksperymentalny z losowym położeniem progu aktywacji genu oraz losowym czasem podania leku, który wydaje się być najbliższy rzeczywistym układom biologicznym. Wyniki tych badań przedstawione są w kolejnych podrozdziałach.

4.5.1 Losowe położenie progu aktywacji genu

Na początku przeanalizowałam zachowanie populacji komórkowej, w której aktywacja genu zachodzi przy różnych wartościach progowych. W celu zróżnicowania granic między domenami, wartości progowe θ_P losowałam z rozkładu normalnego, o średniej równej nominalnej wartości θ_P, zgodnie z algorytmem opisanym w sekcji 3.4. W zależności od modelu, dobrałam różne wartości odchylenia standardowego rozkładu normalnego, a w niniejszej pracy przedstawiłam wyniki symulacji dla populacji dla dwóch przykładowych odchyleniach, które dobrze obrazują otrzymywane rezultaty. W przypadku modelu ze sprzężeniem dodatnim, przedstawiłam wyniki symulacji dla populacji (1000 komórek), w których odchy-

lenie standardowe wynosi 10% albo30% wartości progowej. Przesunięcie wartości progowej skutkuje zmianą poziomu białka w chwili przejścia trajektorii do drugiej domeny. Jako że tempo produkcji jest takie samo we wszystkich komórkach, przesunięcie wartości progowej powoduje jedynie zmianę chwili przełączenia. W przypadku układu ze sprzężeniem dodatnim, obniżenie wartości progowej powoduje aktywację drugiego genu w komórce z niższym poziomem białka, niż w układzie natywnym. W efekcie czego pojawia się zróżnicowanie trajektorii czasowych, startujących z tego samego warunku początkowego (Rysunek 4.7A i B). W modelu z większym odchyleniem standardowym, zakres zmienności odpowiedzi również jest większy. W części populacji poziom białka przed podaniem leku stabilizuje się na niższej wartości — w układzie pojawia się punkt stacjonarny, w domenie poniżej wartości progowej. Warunek na występowanie punktu RSP w domenie poniżej wartości progowej, przed podaniem leku jest podany w równaniu 4.65. Przy zmienności θ_P na poziomie 10% wartości, maksymalna wartość progowa w populacji nie spełnia tego warunku, natomiast przy większej zmienności (30% θ_P), wylosowana wartość θ_P jest na tyle duża, że warunek opisany równaniem (4.65) jest spełniony i występuje punkt RSP. Po podaniu leku, we wszystkich komórkach następuje gwałtowne obniżenie poziomu białka, przy czym tylko w części komórek zostaje osiągnięty cel terapeutyczny. Zróżnicowanie wartości progowych w populacjach o obu stopniach zróżnicowania, powoduje w części populacji zmniejszenie wartości progowych, w stosunku do średniej w stopniu wystarczającym, aby warunek na występowanie punktu stacjonarnego w domenie powyżej wartości progowej był spełniony (równanie 4.70). W konsekwencji odpowiedź stabilizuje się powyżej celu terapeutycznego. Na histogramach – Rysunek 4.7C i D przedstawiony jest czas osiągnięcia celu terapeutycznego od podaniu leku. W populacji o $SD = 10\%\,\theta_P$ w około 40% komórek nie został osiągnięty cel terapeutyczny (Rysunek 4.7C; różowy słupek dla wartości poniżej 0) – wartość progowa jest tak duża, że komórki nie przechodzą do domeny o tylko jednym aktywnym genie, a cel terapeutyczny jest na tyle niski, że aby go zrealizować wybraną dawką leku konieczne jest przejście do drugiej domeny. W populacji o $SD = 30\%\,\theta_P$ subpopulacja o niezrealizowanym celu jest jeszcze większa i sięga prawie 50% komórek (Rysunek 4.7D). Na histogramie (Rysunek 4.7D) widoczna jest również subpopulacja komórek, która osiągnęła cel terapeutyczny bardzo szybko, w chwili około 15 godzin. Jest to subpopulacja komórek, które miały znacznie niższy poziom białka w chwili podania leku, dlatego szybciej osiągnęły cel.

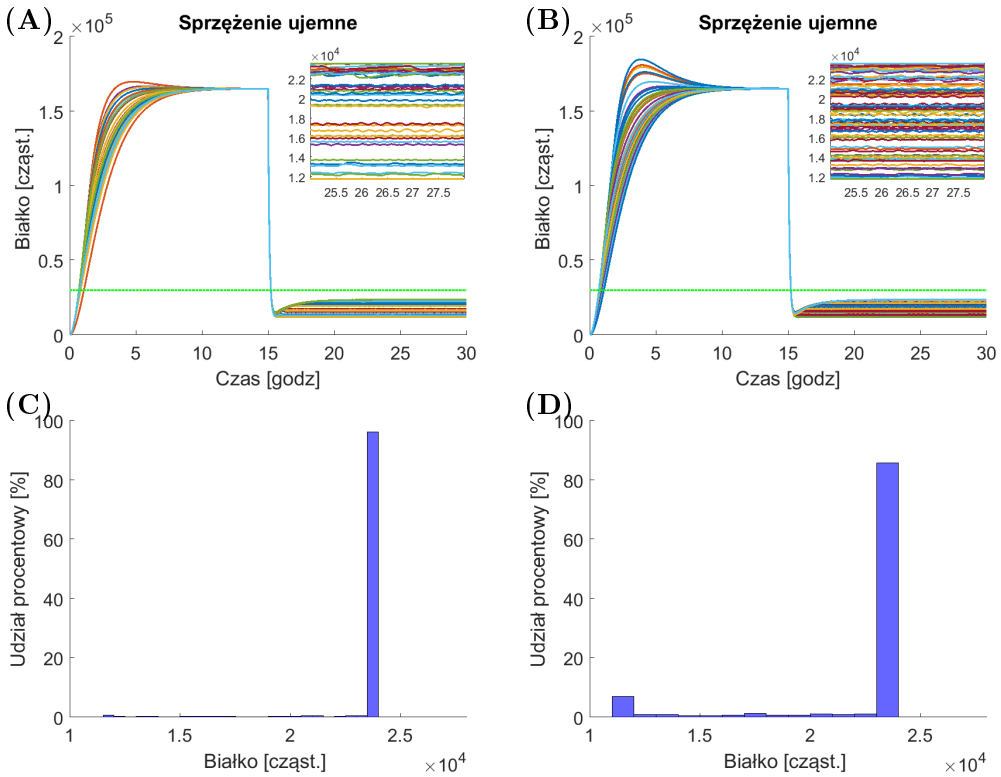
W modelu ze sprzężeniem ujemnym, konieczne było zastosowanie większych wartości odchylenia standardowego, aby zaobserwować zróżnicowanie populacji. Ponadto w przebiegach czasowych części komórek, można zaobserwować przeregulowanie, wynikające z obecności ujemnego sprzężenia zwrotnego (Rysunek 4.8 A i B). Po podaniu leku następuje gwałtowne obniżenie poziomu białka, a końcowe jego wartości są zróżnicowane. W modelu z odchyleniem standardowym równym $30\%\,\theta_P$, zdecydowana większość komórek w stanie końcowym osiąga stan równowagi o wysokim poziomie (około 23 500 cząst.), a w pojedynczych komórkach obserwuje się niższy poziom białka (Rysunek 4.8 C). Natomiast w modelu z odchyleniem równym $50\%\,\theta_P$ zróżnicowanie populacji jest większe. Podobnie jak w na Rysunku 4.8 C, można zaobserwować dużą subpopulację komórek o wysokim poziomie białka, ale jednocześnie pojawia się subpopulacja (około 7% komórek) o stałym, niskim poziomie białka – około 11 000 cząsteczek. W komórkach, w których poziom białka osiąga wartości pośrednie, występują oscylacje, które są widoczne na powiększeniach przebiegów czasowych białka (Rysunek 4.8 A i B). Pomimo różnic w charakterze odpowiedzi, we wszystkich komórkach został osiągnięty cel terapeutyczny. Różnice w czasie



Rysunek 4.7: Odpowiedź populacji heterogenicznej (model ze sprzężeniem dodatnim) na podanie leku; (A) Przebiegi czasowe poziomu białka w populacji o $SD = 10\%\,\theta_P$; (B) Przebiegi czasowe poziomu białka w populacji o $SD = 30\%\,\theta_P$; (C) Udział procentowy populacji osiągającej cel terapeutyczny w określonym czasie ($SD = 10\%\,\theta_P$); (D) Udział procentowy populacji osiągającej cel terapeutyczny w określonym czasie ($SD = 30\%\,\theta_P$); ((A) i (B): Cel terapeutyczny oznaczony zieloną przerywaną linią; (C) i (D): różowy słupek – brak osiągnięcia celu terapeutycznego)

osiągnięcia celu terapeutycznego są bardzo niewielkie, dlatego nie zostały przedstawione na histogramie.

Dla obu odchyleń standardowych największa subpopulacja charakteryzuje się poziomem białka przy górnej granicy obserwowanego zakresu — są to komórki, w których wartość progowa jest wysoka, a obniżenie liczby cząsteczek białka po podaniu leku, spowodowało przejście do domeny poniżej wartości progowej i aktywację drugiego genu. W tej subpopulacji warunek z równania (4.78) jest spełniony. Druga subpopulacja, to komórki o poziomie białka przy dolnej granicy obserwowanego zakresu — w komórkach tych wartość progowa θ_P jest niższa od punktu RSP w domenie $\{1\}$ po podaniu leku (warunek opisany równaniem (4.82) jest spełniony). W efekcie czego trajektorie układu pozostają w domenie $\{1\}$ i nie następuje aktywacja drugiego genu, dlatego tempo produkcji mRNA jest o połowę niższe, a zatem poziom białka również będzie niższy. Natomiast trzecia grupa to komórki, w których obserwuje się oscylacje poziomu białka. W tej grupie spełniony jest warunek opisany równaniem (4.101), zatem występuje tylko punkt SSP, a różne poziomy końcowe białka wynikają z oscylacji poziomu tego białka wokół wartości progowej (Rysunek 4.8 D).



Rysunek 4.8: Odpowiedź populacji heterogenicznej (model ze sprzężeniem ujemnym) na podanie leku; (A) Przebiegi czasowe poziomu białka w populacji o $SD = 30\%\,\theta_P$; (B) Przebiegi czasowe poziomu białka w populacji o $SD = 50\%\,\theta_P$; (C) Procentowa wielkość populacji z danym poziomem białka w chwili końcowej ($SD = 30\%\,\theta_P$); (D) Procentowa wielkość populacji z danym poziomem białka w chwili końcowej ($SD = 50\%\,\theta_P$) ((A) i (B): Cel terapeutyczny oznaczony zieloną przerywaną linią)

4.5.2 Zróżnicowanie czasu podania leku

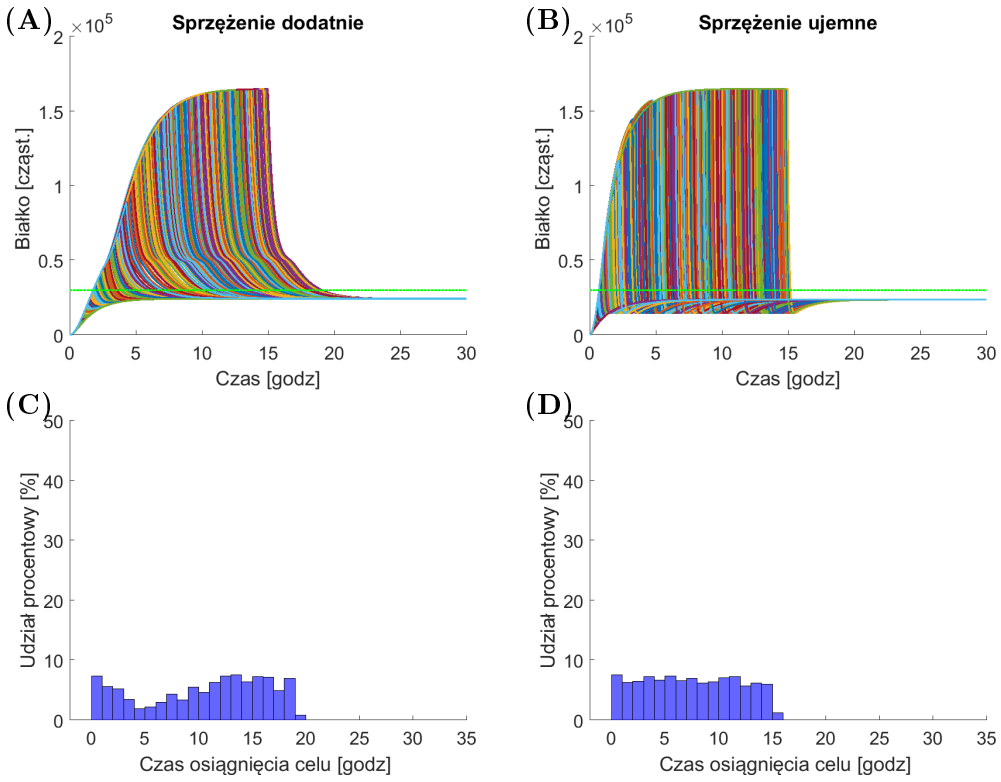
W populacji poziom białka może się znacząco różnić między komórkami, co może powodować różnice w skuteczności danej terapii w populacji heterogenicznej. Zróżnicowany poziom białka może wynikać między innymi z podziałów komórki, czy opóźnienia w aktywacji procesów, takich jak produkcja białka. Przeważnie poziom białka nie jest regulowany przez tylko jeden czynnik, a wzajemne zależności pomiędzy różnymi aktywatorami i inhibitorami procesów mogą powodować, że rzeczywista komórka nie będzie w stanie równowagi. Również podziały komórki bardzo silnie wpływają na poziomy białek w danej chwili w komórce. Jednocześnie, mając na uwadze, że przedstawiony model dotyczy procesu chorobotwórczego, należy uwzględnić, że komórki mogą mieć różną wrażliwość na bodźce zewnętrzne i mogą z opóźnieniem aktywować reakcję produkcji białek. W niniejszym podrozdziale zbadałam jak poziom białka w chwili podania leku wpływa na aktywowaną odpowiedź i osiągnięcie celu terapeutycznego.

W celu zamodelowania wpływu różnych poziomów białka w chwili rozpoczęcia terapii, wykonałam symulacje populacji komórkowej z różnym czasem podania leku t_D. W układzie, startującym z zerowych warunków początkowych, czas podania leku może wpływać na poziom białka przed terapią, zanim układ dojdzie do poziomu nasycenia. Czas podania

leku został wylosowany z rozkładu równomiernego, w zakresie od 0 do 15 godzin. Dzięki temu możliwe było zbadanie wpływu podania leku, zarówno przy niskim, jak i wysokim poziomie białka. Poziom białka w momencie podania leku przekłada się bezpośrednio na czas osiągnięcia celu terapeutycznego, wcześniejsze podanie leku pozwala na wcześniejsze osiągnięcie celu (Rysunek 4.9A i B). Zarówno w modelu ze sprzężeniem dodatnim, jak i ujemnym, czas podania leku (a więc również poziom białka w momencie podania leku) nie wpływa na poziom białka w stanie ustalonym (Rysunek 4.9A i B). Czas podania leku nie wpływa na pojawienie się nowych punktów stacjonarnych, ani na lokalizację obecnego punktu stacjonarnego. Na wykresach – Rysunek 4.9C i D przedstawione są histogramy czasu osiągnięcia celu terapeutycznego od chwili podania leku. Model ze sprzężeniem dodatnim ma znacznie dłuższy maksymalny czas odpowiedzi — maksymalny czas osiągnięcia celu wynosi 21 godzin (Rysunek 4.9C), a w przypadku modelu ze sprzężeniem ujemnym jest to około 16 godzin (Rysunek 4.9D). Czas osiągnięcia celu terapeutycznego, w modelu ze sprzężeniem ujemnym, ma rozkład równomierny w zakresie od 0 do 15 godzin, co bezpośrednio wynika z zastosowanego rozkładu równomiernego (Rysunek 4.9 D). Natomiast, na histogramie czasu osiągnięcia celu terapeutycznego, w modelu ze sprzężeniem dodatnim, widoczne są dwa maksima. Pierwsze maksimum występuje dla niskich wartości czasu i wynika z szybkiego osiągnięcia celu w komórkach, w których poziom białka nie jest wyższy od wartości progowej – w komórkach tych jest aktywny tylko jeden gen, przez co poziom białka szybko spada. Natomiast drugie maksimum występuje dla czasu około 15 godzin po podaniu leku. Na przebiegach czasowych widoczne jest stopniowe obniżanie się poziomu białka w domenie z dwoma aktywnymi genami. Następnie trajektorie przechodzą poniżej wartości progowej i jeden z genów jest dezaktywowany, co pozwala na dalszy spadek poziomu białka (Rysunek 4.9 C). Niskie wartości około godziny 5 wynikają z spowolnienia spadku poziomu białka, przed przejściem do domeny poniżej wartości progowej.

4.5.3 Zróżnicowanie progu aktywacji genu oraz czasu podania leku

W rzeczywistych przypadkach występuje zarówno zróżnicowanie progu aktywacji genu, jak i poziomu białka w chwili podania leku, dlatego wykonałam również eksperyment badający jednoczesny wpływ zróżnicowania populacji pod względem aktywacji genów oraz o zróżnicowanym czasie podania leku do komórki (skutkującym zróżnicowaniem poziomu białka w chwili podania leku). W przeprowadzonych symulacjach populacji komórkowej, próg aktywacji produkcji mRNA losowałam z rozkładu normalnego o średniej θ_P i odchyleniu standardowym równym $30\%\,\theta_P$, ze względu na duże zróżnicowanie odpowiedzi w analizowanych układach. Czas podania leku losowałam z rozkładu równomiernego, w zakresie od 0 do 15 godzin. W modelu ze sprzężeniem dodatnim populacja dzieli się na dwie subpopulacje o różnych, końcowych poziomach białka. Wysoki, końcowy poziom białka jest zlokalizowany znacznie powyżej wartości progowej, przez co charakteryzuje subpopulację, w której cel terapeutyczny nie został osiągnięty (Rysunek 4.10A). Porównując wynik z wynikiem symulacji populacji bez zróżnicowania czasu podania leku, widoczne jest znaczne zmniejszenie wielkości subpopulacji, w której poziom białka jest powyżej celu terapeutycznego (36% (Rysunek 4.10C) vs 47% (Rysunek 4.7D)). Wczesne podanie leku, zanim poziom białka osiągnie wysokie wartości, pozwala na zmniejszenie poziomu białka w chwili końcowej w niektórych komórkach, dzięki utrzymaniu trajektorii w basenie przyciągania punktu równowagi, o niskim poziomie białka. Kształt histogramu czasu, który upłynął od podania leku do osiągnięcia celu terapeutycznego, podobnie jak w populacji o jednakowej



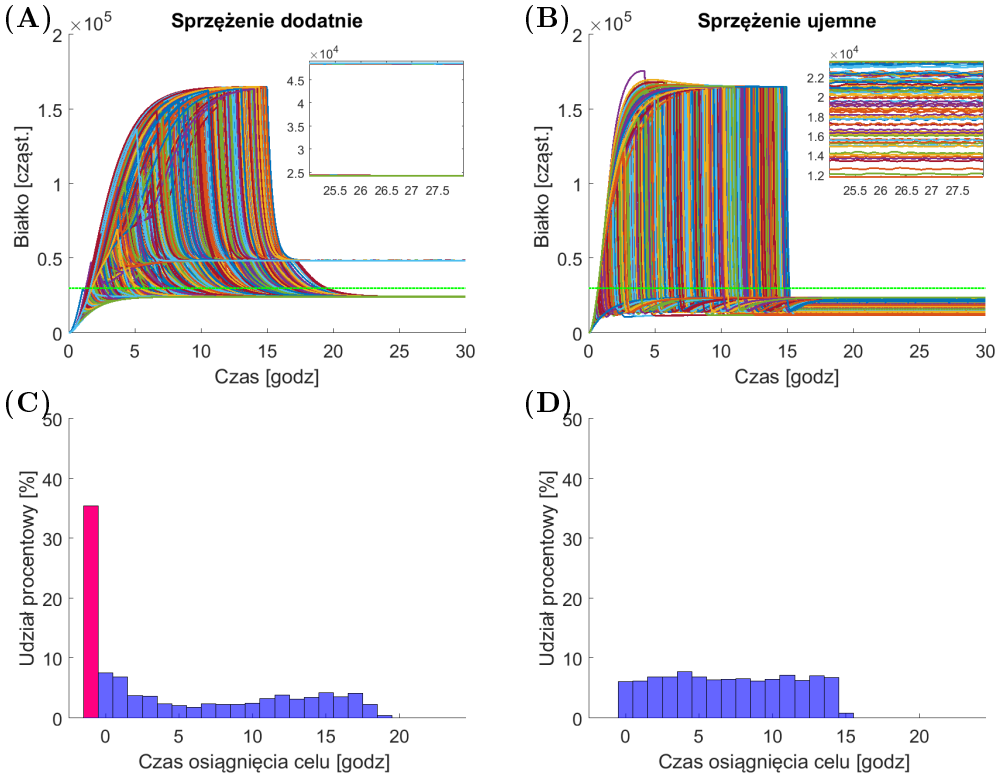
Rysunek 4.9: Odpowiedź populacji o zróżnicowanym czasie podania leku; (A) Przebiegi czasowe poziomu białka w układzie ze sprzężeniem dodatnim; (B) Przebiegi czasowe poziomu białka w układzie ze sprzężeniem ujemnym; (C) Histogram czasu osiągnięcia celu terapeutycznego w modelu ze sprzężeniem dodatnim; (D) Histogram czasu osiągnięcia celu terapeutycznego w modelu ze sprzężeniem ujemnym

wartości progowej θ_P (Rysunek 4.9C) ma dwa maksima: pierwsze jest związane z szybkim osiągnięciem celu, ze względu na podanie leku do komórek o niskim poziomie białka (a nawet komórek, w których poziom białka jest niższy, niż cel terapeutyczny) oraz drugie wynikające z czasochłonnego procesu obniżenia poziomu białka w komórkach z dwoma aktywnymi genami, następnie dezaktywacji genu oraz dalszego obniżenia poziomu poniżej celu terapeutycznego (Rysunek 4.10C).

W modelu ze sprzężeniem ujemnym, końcowy poziom białka jest podobny, jak w modelu bez zróżnicowania czasu podania leku (Rysunek 4.8A i B), co wynika z oscylacji wokół wartości granicznej dla pewnych wartości θ_P (Rysunek 4.10B). Patrząc na histogram czasu, który upłynął od podania leku do osiągnięcia celu terapeutycznego, w modelu ze sprzężeniem ujemnym, widoczny jest jego równomierny kształt. W tym przypadku, lokalizacja wartości progowej dla białka nie wpływa na czas osiągnięcia celu, ponieważ spadek poziomu białka jest bardzo szybki (Rysunek 4.10D).

4.6 Modele produkcji białka z losowym przełączeniem

Proces aktywacji i dezaktywacji genu jest procesem losowym, zależnym od przyłączenia się odpowiednich cząsteczek regulacyjnych oraz czynników transkrypcyjnych. Wraz ze wzro-



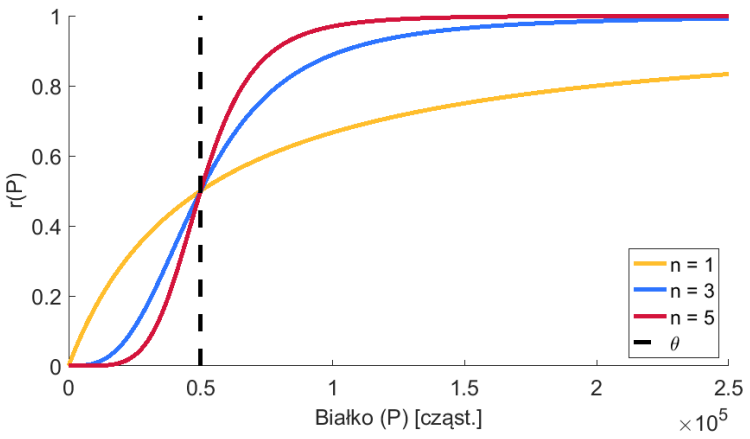
Rysunek 4.10: Odpowiedź populacji na zróżnicowanie progu aktywacji genu oraz czasu podania leku; (A) Przebiegi czasowe poziomu białka w układzie ze sprzężeniem dodatnim ($SD = 30\,\%\,\theta_P$); (B) Przebiegi czasowe poziomu białka w układzie ze sprzężeniem ujemnym ($SD = 30\%\,\theta_P$); (C) Histogram czasu osiągnięcia celu terapeutycznego po podaniu leku w modelu ze sprzężeniem dodatnim ($SD = 30\%\,\theta_P$); (D) Histogram czasu osiągnięcia celu terapeutycznego po podaniu leku w modelu ze sprzężeniem ujemnym ($SD = 30\%\,\theta_P$) (różowy słupek – brak osiągnięcia celu terapeutycznego)

stem liczby czynników transkrypcyjnych, wzrasta prawdopodobieństwo aktywacji danego genu, natomiast wzrost liczby inhibitora czynnika transkrypcyjnego, powoduje np. zwiększenie prawdopodobieństwa dezaktywacji genu lub zmniejsza prawdopodobieństwo jego aktywacji.

Losowość procesu przełączenia stanu genu w modelu produkcji białka została zamodelowana zgodnie z zaproponowanym przeze mnie algorytmem opisanym w sekcji 3.5. W analizowanych modelach stan genu, pośrednio oznaczany jako zmienna Z_P, jest zależny od liczby cząsteczek białka, w sposób opisany sigmoidalną funkcją, która ma przedstawiać rozmytą wartość progową. W tym celu została wykorzystana funkcja Hilla opisana wzorem:

$$r(P) = \frac{P^n}{P^n + \theta_P^n}, \tag{4.102}$$

gdzie n to współczynnik Hilla opisujący skośność funkcji. W modelu ze sprzężeniem dodatnim, aby określić, czy gen jest aktywny czy nie, losuję liczbę z rozkładu równomiernego z zakresu $[0, 1]$ i porównuję ją z wartością funkcji $r(P)$. Jeśli liczba losowa jest mniejsza od $r(P)$, to gen jest aktywny. W układzie ze sprzężeniem ujemnym sytuacja jest odwrotna, a



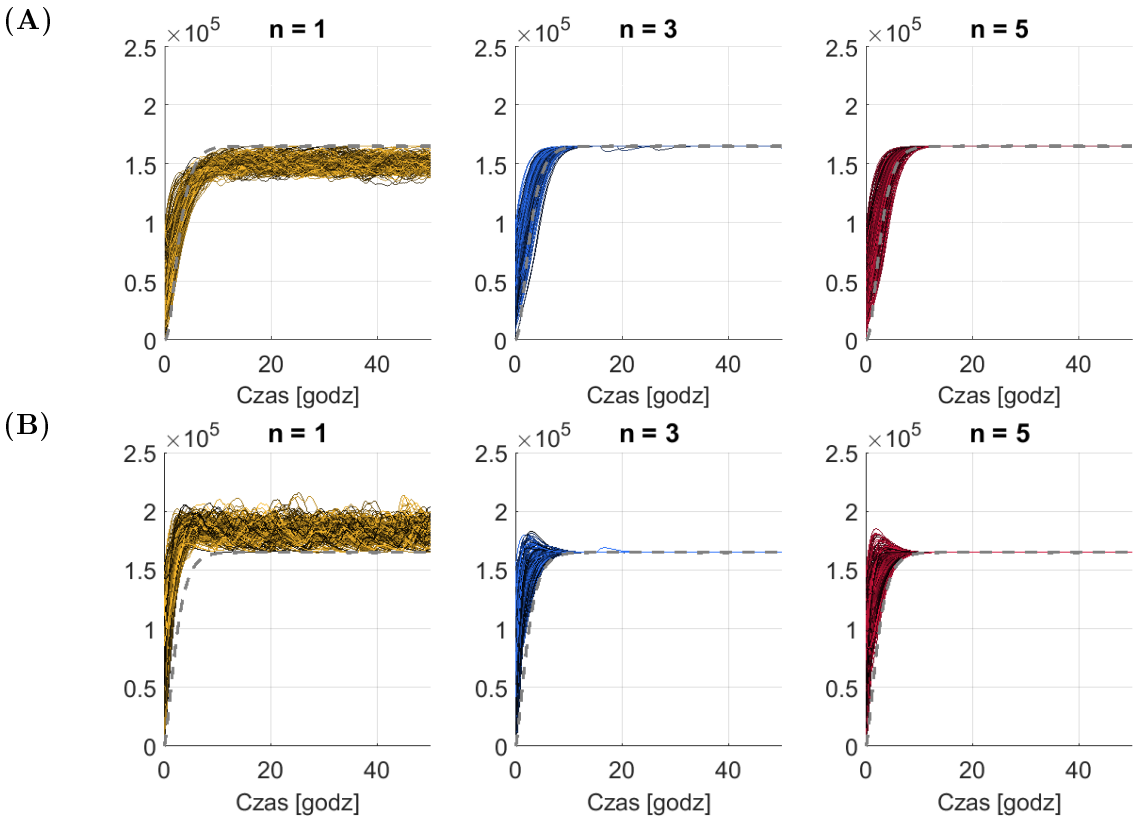
Rysunek 4.11: Zależność wartości prawdopodobieństwa w funkcji liczby cząsteczek białka, dla różnych wartości współczynnika Hilla n. Wartość progowa $\theta_P = 5 \cdot 10^4$.

wartość losowa mniejsza od funkcji prawdopodobieństwa oznacza, że gen jest nieaktywny. Wraz ze wzrostem liczby cząsteczek białka, wzrasta prawdopodobieństwo aktywacji lub dezaktywacji genu (w zależności od sprzężenia). Dla wysokich wartości parametru Hilla (w tym przypadku $n = 5$) układ jest hiperwrażliwy na zmianę liczby cząsteczek białka w bliskiej okolicy wartości progowej, a funkcja prawdopodobieństwa ma kształt bardziej zbliżony do funkcji skokowej. Natomiast układy o niskich wartościach parametru Hilla (np. $n = 1$), mają szerokie spektrum wrażliwości procesu na stężenie białka – nawet przy niskiej liczności białka w komórce, istnieje możliwość aktywacji procesu, ale jednocześnie wysoka liczność białka nie gwarantuje aktywacji procesu (Rysunek 4.11).

Losowa aktywacja genów powoduje zróżnicowanie tempa transkrypcji mRNA, a przez to powoduje zróżnicowanie poziomu białka w populacji. Losowość przełączeń może być głównym czynnikiem różnicującym populację, ale również jej odpowiedź na terapię [68]. Głównym wyznacznikiem przy dobieraniu dawki leku jest skuteczność terapii, np. uzyskanie pożądanego poziomu białka w komórkach. Jednak ze względu na toksyczność leków, nowoczesne podejście do planowania terapii zakłada takie dobranie stężenia leku, aby negatywny wpływ na organizm był jak najmniejszy. Dobranie leku zapewniającego skuteczną terapię jest zadaniem zarówno ważnym, jak i bardzo trudnym. Badania teoretyczne, takie jak przedstawione w niniejszej rozprawie, mogą nas do tego celu przybliżyć.

Aby zbadać zależność między zróżnicowaniem populacji komórkowej o różnych typach autoregulacji a minimalną, efektywną dawką leku przeprowadziłam eksperyment *in silico* uwzględniający losowość aktywacji genów. Rozpatrując model produkcji białka opisany równaniami (4.2) - (4.7), zróżnicowanie populacji komórkowej wynika z różnej wrażliwości na obecność czynników regulatorowych (P). Różna wrażliwość komórki jest modelowana poprzez różne wartości parametru Hilla n, regulujące skośność funkcji (równanie (4.102)). W każdym z badanych przypadków populacja jest złożona z 500 komórek. Ze względu na losowość aktywacji genów, przebiegi czasowe poziomów białka w komórkach, należących do populacji, startujące z tych samych warunków początkowych, różnią się między sobą. Zakres zróżnicowania odpowiedzi jest zależny od parametru Hilla (n). Niezależnie od rodzaju autoregulacji, odpowiedź populacji hiperwrażliwej na wartość progową białka ($n = 5$) jest mało zróżnicowana, a odpowiedź w stanie ustalonym jest zbliżona do odpowiedzi deter-

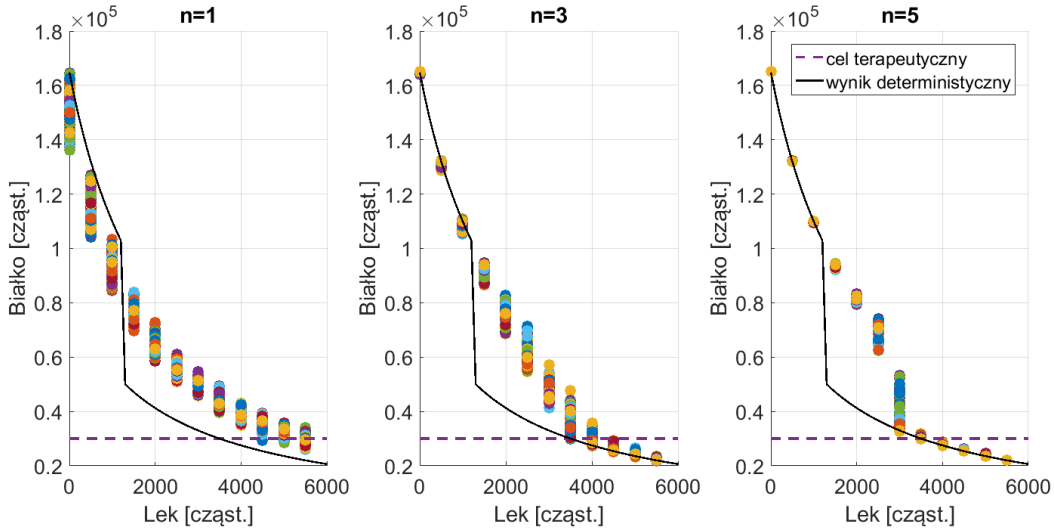
ministycznej ($1.65 \cdot 10^4$) (Rysunek 4.12A i B: trzecia kolumna). Dla $n = 3$ zróżnicowanie populacji jest większe, ale nadal średni poziom białka stabilizuje się na wartości zbliżonej do wartości w układzie deterministycznym (Rysunek 4.12A i B, druga kolumna). Natomiast w komórkach, w których procesy aktywacji i dezaktywacji genów zachodzą nawet przy liczbie białka dalekiej od wartości progowej ($n = 1$), zróżnicowanie populacji jest bardzo duże. Przebiegi czasowe charakteryzują się dużą wariancją w stosunku do poziomu średniego (Rysunek 4.12A i B, pierwsza kolumna). Średni poziom białka w układzie ze sprzężeniem dodatnim jest znacznie niższy od odpowiedzi deterministycznej (Rysunek 4.12A, pierwsza kolumna). W układzie ze sprzężeniem ujemnym niska wartość parametru n skutkuje podwyższeniem wartości średniej poziomu białka (Rysunek 4.12B, pierwsza kolumna).



Rysunek 4.12: Przebiegi czasowe poziomu białka w przykładowych 200 komórkach dla różnych wartości współczynnika n bez podania leku; (A) w układzie ze sprzężeniem dodatnim; (B) w układzie ze sprzężeniem ujemnym; (Szarą, przerywaną linią oznaczono odpowiedź deterministyczną)

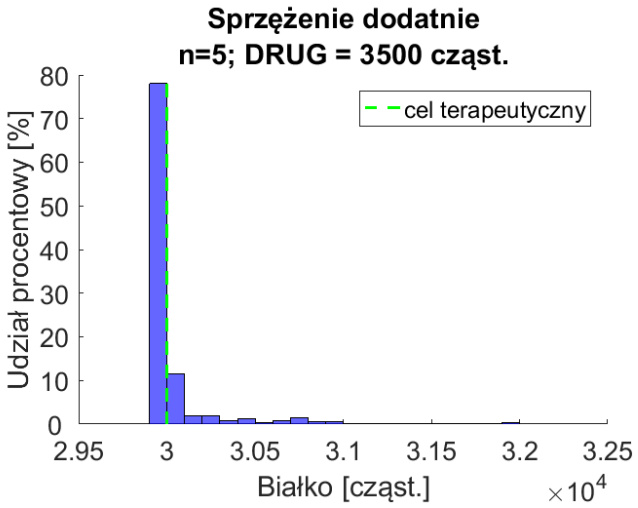
Układ ze sprzężeniem dodatnim

Na wykresach – Rysunek 4.13 zostały przedstawione końcowe poziomy białek, w układzie ze sprzężeniem dodatnim, w populacji o różnych wartościach parametru n oraz pod wpływem różnych dawek leku. Każda populacja składa się z 500 komórek, w których proces aktywacji i dezaktywacji genu jest losowy. We wszystkich populacjach podanie leku



Rysunek 4.13: Końcowy poziom białka w populacji o różnej wrażliwości (parametr n) przy różnych dawkach leku (układ ze sprzężeniem dodatnim). Różne kolory oznaczają różne komórki w populacji.

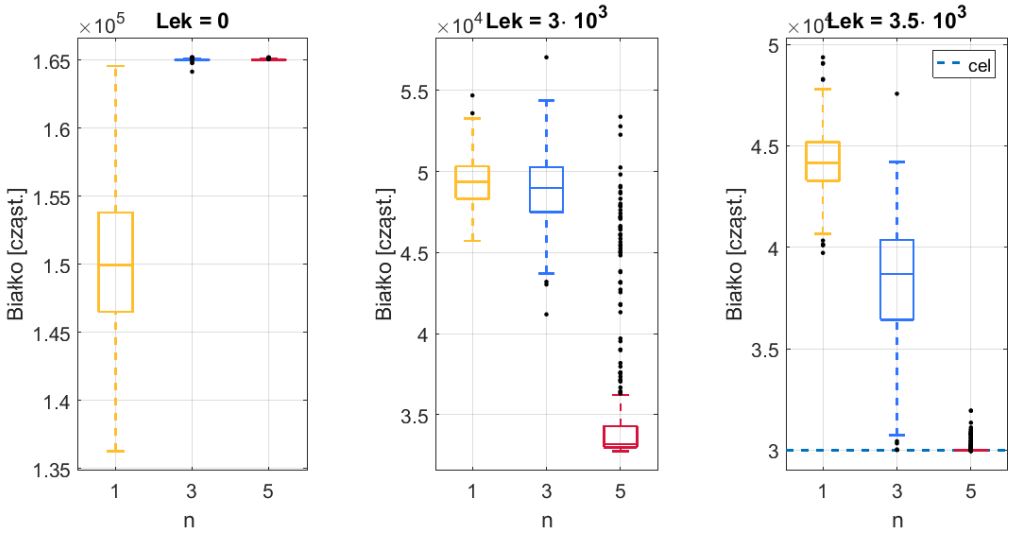
powoduje obniżenie poziomu białka, co jest zgodne z wynikiem symulacji modelu deterministycznego. Na przebiegu deterministycznym (Rysunek 4.13 czarna linia) widoczny jest gwałtowny spadek poziomu białka, który wynika z przejścia trajektorii z basenu przyciągania punktu RSP, w domenie powyżej wartości progowej do basenu przyciągania punktu RSP, w domenie poniżej wartości progowej. W populacji komórkowej nawet bez podania leku, widoczne jest bardzo duże zróżnicowanie populacji o dużym zakresie wrażliwości na białko ($n = 1$), w porównaniu do populacji o $n = 3$ i $n = 5$. W populacji o $n = 1$, wraz ze wzrostem dawki leku występuje zmniejszenie średniego poziomu białka oraz zakresu obserwowanych odpowiedzi. W populacjach o $n = 3$ i $n = 5$, wraz ze wzrostem dawki leku również następuje spadek średniego poziomu białka, ale największy zakres odpowiedzi obserwuje się dla średnich dawek leku. Szczególnie jest to widoczne w populacji o małej wrażliwości ($n = 5$), gdzie przy niskiej i wysokiej dawce leku odpowiedź jest bardzo homogeniczna, a przy dawce 3 000 cząsteczek zakres odpowiedzi jest bardzo duży (Rysunek 4.13, trzeci wykres). To zachowanie jest przeanalizowane w dalszej części sekcji. Wyliczona, na podstawie modelu deterministycznego, minimalna skuteczna dawka leku (równanie (4.8)) wynosi 3500 cząsteczek. W przypadku zróżnicowanej populacji komórkowej okazuje się, że dawka ta nie jest wystarczająca, aby wywołać pożądane obniżenie poziomu białka, nawet w części komórek. Skuteczność terapii w populacji z $n = 1$ oraz $n = 3$ jest zerowa. Natomiast w populacji o małym zróżnicowaniu ($n = 5$) terapia jest skuteczna w 78% komórek populacji (skuteczność terapii jest określona wyłącznie na podstawie ostatniego punktu czasowego), co zostało przedstawione na histogramie końcowych wartości poziomu białka (Rysunek 4.14). Aby zapewnić skuteczność terapii także w przypadku bardziej zróżnicowanych populacji, konieczne jest zastosowanie większych dawek leku. W populacji o dużym zróżnicowaniu ($n = 1$) dawka 5 000 cząsteczek powoduje obniżenie poziomu białka poniżej wartości progowej u zaledwie 1% komórek, a podniesienie dawki do 5 500 cząst. pozwala na osiągnięcie celu w 42% komórek. W populacji o $n = 3$ dawka leku, pozwalająca osiągnąć cel terapeutyczny we wszystkich komórkach, wynosi między 4 500 a 5 000 cząsteczek. W



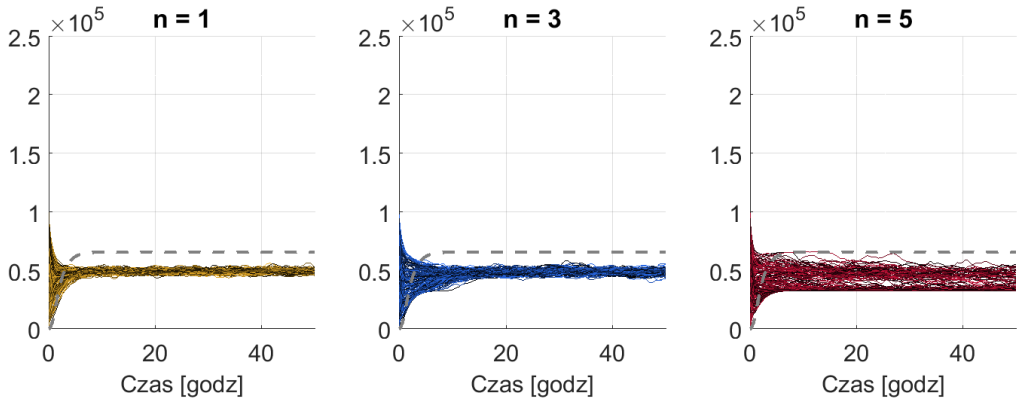
Rysunek 4.14: Histogram końcowego poziomu białka w populacji mało wrażliwej na niski poziom białka ($n = 5$) po podaniu leku w dawce $3.5 \cdot 10^3$ (układ ze sprzężeniem dodatnim). Cel terapeutyczny oznaczony przerywaną, zieloną linią.

układzie ze sprzężeniem dodatnim, średni poziom białka przed podaniem leku jest niższy niż w modelu deterministycznym. Jednak losowa aktywacja genu, skutkuje mniejsza wrażliwością populacji na lek, przez konieczne jest podanie większej dawki leku, niż w układzie deterministycznym, aby osiągnąć cel terapeutyczny.

Zróżnicowanie poziomów białka w ostatniej chwili czasu, w populacjach o różnych wartościach parametru n oraz przy różnych dawkach leku jest przedstawione w postaci wykresów pudełkowych (Rysunek 4.15). W stanie przed podaniem leku, poziom białka jest najniższy i najbardziej zróżnicowany w populacji o szerokim zakresie wrażliwości ($n = 1$) (Rysunek 4.15, pierwszy wykres). Po zadziałaniu dużą dawką leku (3 500 cząsteczek), najniższy poziom białka występuje w populacji o małym zakresie wrażliwości na poziom białka ($n = 5$), natomiast największe zróżnicowanie jest w populacji $n = 3$, co wynika z przyciągania przez dwa punkty stacjonarne w domenach po przeciwnych stronach wartości progowej (Rysunek 4.15, trzeci wykres). Wpływ istnienia dwóch punktów stacjonarnych w układzie jest szczególnie widoczny w populacji o $n = 5$ po podaniu 3 000 cząsteczek leku (Rysunek 4.15, środkowy wykres), gdzie czerwony wykres ma bardzo dużą liczbę punktów odstających. Analizując przebieg czasowy dla tego układu ($n = 5$, $DRUG = 3 \cdot 10^3$), po podaniu leku jest widoczny podział populacji na dwie subpopulacje – dominuje populacja o niskim poziomie białka, ale duża część komórek oscyluje na poziome białka zbliżonym do wartości progowej $\theta_P = 50\,000$ cząst. (Rysunek 4.16, trzeci wykres). W populacjach o $n = 1$ oraz $n = 3$ nie obserwuje się podziału populacji na dwie części, ale zakres zmienności dla populacji $n = 3$ jest większy niż dla populacji $n = 1$ (Rysunek 4.16, pierwszy i drugi wykres). Duża wrażliwość komórek na szeroki zakres liczby białka (czyli niska wartość parametru n) powoduje, że przełączenia między stanami genów zdarzają się bardzo często i są w małym stopniu zależne od stanu układu. W rezultacie odpowiedź modelu ma charakter białego szumu.



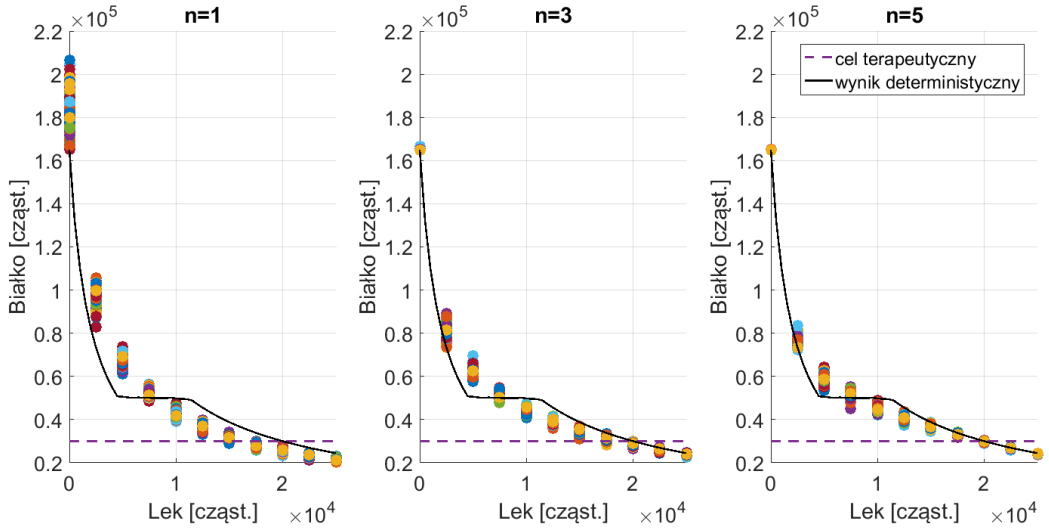
Rysunek 4.15: Zakres zróżnicowania populacji komórkowej o różnej wrażliwości (parametr n) przy różnych dawkach leku (układ ze sprzężeniem dodatnim); (na wykresach przedstawiony poziom białka w chwili końcowej; różnymi kolorami oznaczone są różne wartości parametru n, zgodnie z wartościami na osi x.)



Rysunek 4.16: Przebieg poziomu białka w populacji o różnej wrażliwości (parametr n) po podaniu 3 000 cząsteczek leku (układ ze sprzężeniem dodatnim, 200 komórek na każdym wykresie); (szara, przerywana linia – odpowiedź deterministyczna)

Układ ze sprzężeniem ujemnym

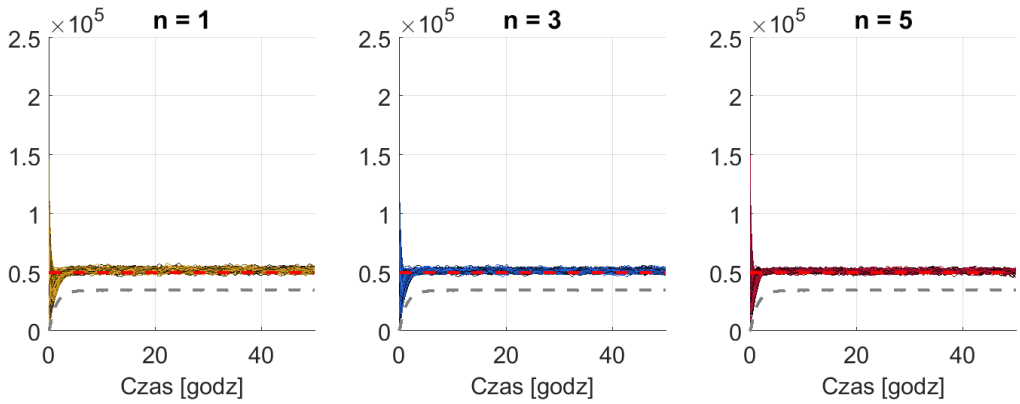
Skuteczna dawka leku w modelu ze sprzężeniem ujemnym została określona poprzez analityczne obliczenia i wynosi 20 000 cząsteczek (sekcja 4.1). W układzie ze sprzężeniem ujemnym wraz ze wzrostem dawki leku spada zróżnicowanie poziomów białka w ostatniej chwili symulacji. Na wykresie – Rysunek 4.17 widoczne jest również, że dla niższych wartości n, dawka leku, efektywna w całej analizowanej populacji komórkowej, jest mniejsza niż w rozwiązaniu deterministycznym — punkty końcowych poziomów białka w symulacjach stochastycznych są poniżej rozwiązania deterministycznego od dawki leku 12 500 cząsteczek. W rozwiązaniu deterministycznym widoczny jest brak zmian poziomu białka dla zakre-



Rysunek 4.17: Końcowy poziom białka w populacji o różnej wrażliwości (parametr n) przy różnych dawkach leku (układ ze sprzężeniem ujemnym).Różne kolory oznaczają różne komórki w populacji

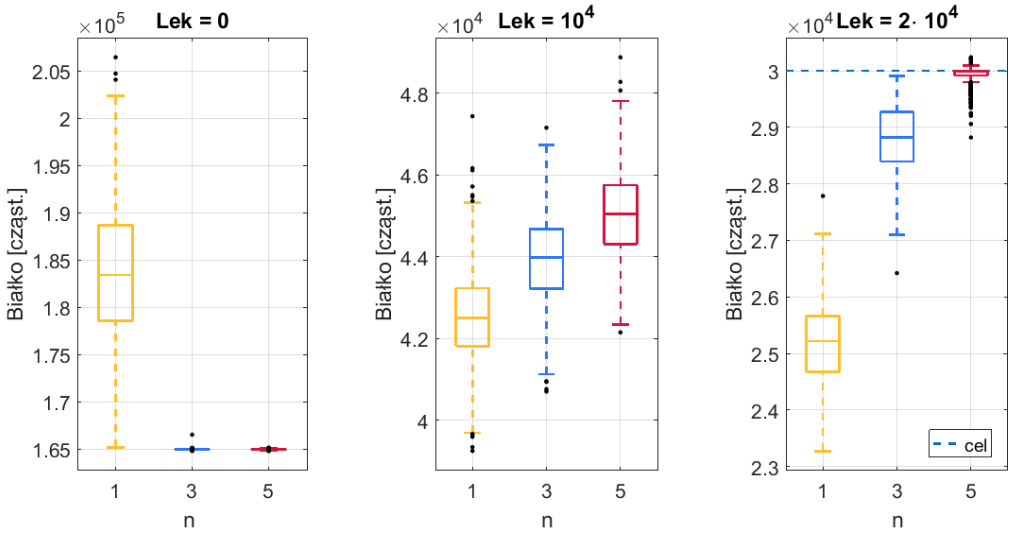
su dawki leku, odpowiadającej występowaniu punktu SSP (Rysunek 4.4B). W populacji wrażliwej na szeroki zakres ilości białka ($n = 1$), już dawka 17 500 cząsteczek leku gwarantuje 100-procentową skuteczność. Terapia lekiem w liczbie 20 000 cząsteczek pozwala na uzyskanie 100% skuteczność w populacji o $n = 3$, natomiast w populacji o $n = 5$, przy dawce $DRUG = 20\,000$ cząst., 70% komórek osiąga cel terapeutyczny. Zatem, w układzie ze sprzężeniem ujemnym, wraz ze wzrostem zróżnicowania populacji (czyli spadkiem wartości n), zwiększa się wrażliwość na działanie leku. W modelu ze sprzężeniem ujemnym, na przebiegach czasowych widoczne jest, że populacja o niskiej wartości n charakteryzuje się zarówno wysokim średnim poziomem białka, jak i dużym zakresem zmienności, w porównaniu do pozostałych populacji (Rysunek 4.12 B), co widoczne jest również na wykresach pudełkowych przedstawionych na Rysunku 4.19, pierwszy wykres.

Dla $n = 3$ oraz $n = 5$ zróżnicowanie populacji jest bardzo małe, a wartości średnie zbliżone do wartości modelu deterministycznego. Zróżnicowanie populacji przy średnich dawkach leku ($DRUG = 7\,500$ cząst.) wynika z oscylacji wartości progowych wokół wartości granicznej θ_P (Rysunek 4.18). Po podaniu dawki leku, sugerowanej obliczeniami deterministycznymi, we wszystkich analizowanych populacjach komórkowych nastąpiło znaczne obniżenie poziomu białka — cel terapeutyczny jest zrealizowany przez większość populacji, we wszystkich przypadkach. Wraz ze wzrostem n, spada zróżnicowanie populacji (Rysunek 4.19, trzeci wykres). Przy pośredniej dawce leku (10 000 cząsteczek) odchylenie standardowe w układach jest zbliżone i wynosi odpowiednio: 1158, 1081 i 1037 cząsteczek dla populacji o n równych 1, 3 i 5 (Rysunek 4.19, drugi wykres). Sprzężenie ujemne w systemie regulacji produkcji białka, skutkuje zwiększeniem wrażliwości modelu stochastycznego na lek, w porównaniu do modelu deterministycznego. Wraz ze wzrostem parametru Hilla, wzrasta wartość minimalnej, skutecznej dawki leku dla populacji. Jednocześnie, dla średnich dawek leku, obserwuje się zbliżone odchylenia standardowe poziomów białka, niezależnie od parametru Hilla. Wynika to z dominującego wpływu bliskości wartości granicznej na częstość przełączeń. Przeciwna sytuacja ma miejsce w układach ze sprzężeniem dodatnim,



Rysunek 4.18: Przebieg poziomu białka w populacji komórek o różnych wartościach parametru n po podaniu 7 500 cząsteczek leku (układ ze sprzężeniem ujemnym, 200 przykładowych komórek na każdym wykresie) (Szara, przerywana linia - odpowiedź deterministyczna, czerwona linia - wartość progowa)

w których populacja stochastyczna jest mniej wrażliwa na lek, w porównaniu do modelu deterministycznego, a dla średnich dawek leku występuje duże zróżnicowanie odpowiedzi populacji.



Rysunek 4.19: Zakres zróżnicowania populacji komórkowej scharakteryzowanych różnymi wartościami parametru n przy różnych dawkach leku (układ ze sprzężeniem ujemnym). Na wykresach przedstawiono poziom białka w chwili końcowej.

4.7 Dyskusja

Systemy kawałkami liniowe mają wiele zastosowań ze względu na zdolność do posiadania równocześnie kilku typów zachowania. Przełączenia powodują skokową zmianę struktury i/lub wartości parametrów, co skutkuje zmianą dynamiki. Dzięki temu, nawet stosunkowo

prosty model może prawidłowo oddawać dynamikę skomplikowanego systemu. Przedstawiona w niniejszym rozdziale analiza pozwoliła, z jednej strony na zaprezentowanie metodyki analizy układów z przełączeniami na prostym przykładzie, a z drugiej strony na scharakteryzowanie prostego układu biologicznego.

Analizowany układ biologiczny to prosty model produkcji białka, uwzględniający dwa różne typy autoregulacji: sprzężenie dodatnie oraz sprzężenie ujemne. Zakładamy, że istnieje możliwość oddziaływania na niniejszy układ poprzez podanie leku, zwiększającego tempo degradacji białka. Podanie leku ma na celu obniżenie poziomu białka poniżej wybranego celu terapeutycznego. Przeprowadzona analiza według zaproponowanego schematu (sekcja 3.6) pozwoliła zbadać mi właściwości układu, m.in. podstawową dynamikę odpowiedzi, występowanie punktów równowagi oraz możliwych trajektorii. Zbadałam również wpływ podania leku (modelowanego jako przełączenie zależne od czasu) na zachowanie układu oraz osiągalność celu terapeutycznego. W celu uwzględniania heterogeniczności populacji komórkowej w eksperymentach biologicznych, zbadałam wpływ zróżnicowania właściwości komórek poprzez zrandomizowanie położenia wartości progowej θ_P, oznaczającej wrażliwość komórki na poziom czynnika transkrypcyjnego. Ponadto wykonałam badania wpływu losowości aktywacji genów na zróżnicowanie odpowiedzi komórki. Wszystkie te badania pozwoliły na lepsze poznanie właściwości badanych układów.

Systemy ze sprzężeniem dodatnim pozwalają m.in. na wzmocnienie i utrzymanie sygnału w komórce, co występuje na przykład w wewnątrzkomórkowych kaskadach sygnałowych. W przedstawionym powyżej modelu widać, że układ ze sprzężeniem dodatnim jest bardziej wrażliwy na oddziaływania zewnętrzne niż układ ze sprzężeniem ujemnym. Sprzężenia ujemne są częstym elementem sieci genowo-białkowych ze względu na zdolność do stabilizacji układu oraz niwelowania zakłóceń zewnętrznych. Osiągnięcie celu terapeutycznego było możliwe po podaniu znacznie wyższej dawki leku. Ponadto w takich układach może występować przeregulowanie — po podaniu leku obserwuje się gwałtowne obniżenie poziomu białka, a po pewnym czasie układ stabilizuje się na wyższym poziomie. Takie zachowanie układu może być szczególnie mylące przy badaniach kontrolnych, ponieważ niski poziom białka może sugerować osiągnięcie celu terapeutycznego, co jest prawdą tylko w krótkim horyzoncie czasu. Jednocześnie, dynamika modelu ze sprzężeniem ujemnym jest bardzo szybka, a czas dojścia do stanu równowagi jest znacznie krótszy, niż w układzie ze sprzężeniem dodatnim.

Analityczne wyznaczenie punktów stacjonarnych, wykazało znaczące różnice w dynamice układów z różnymi typami regulacji. W układach ze sprzężeniem dodatnim, dla pewnych zakresów parametrów, występuje bistacjonarność, natomiast w układach ze sprzężeniem ujemnym występuje punkt równowagi typu centrum, wokół którego występują stabilne oscylacje. Analitycznie wyznaczone punkty RSP i SSP posiadają potwierdzenie w symulacjach numerycznych.

Heterogeniczność populacji objawiająca się m.in. różną wrażliwością komórki na obecność czynników regulujących aktywność genu, wpływa zarówno na czas odpowiedzi, jak i poziom końcowy białka. W układzie ze sprzężeniem dodatnim wyznaczyłam analitycznie występowanie dla pewnego zakresu parametrów dwóch punktów RSP jednocześnie. Wykonane następnie badania numeryczne wykazały podział populacji na dwie subpopulacje o różnych poziomach białka (Rysunek 4.7A i B). Takie zachowanie populacji jest istotne z punktu widzenia planowania terapii, a świadomość obecności sprzężenia dodatniego w układzie, pozwoli na przewidzenie możliwego zachowania układu po podaniu leku. W układach ze sprzężeniem ujemnym, również występuje podział na subpopulacje o różnych

typach odpowiedzi, ale zakres zróżnicowania odpowiedzi jest znacznie mniejszy. Poza komórkami, w których występuje stabilizacja poziomu białka w punkcie RSP, można również wyróżnić subpopulację, w której występują oscylacje wokół wartości progowej (Rysunek 4.8A i B). W badanym modelu, ze względu na bardzo szybką dynamikę, oscylacje te są bardzo niewielkie, ale w bardziej rzeczywistym modelu, uwzględniającym transport mRNA oraz pośrednie formy białka, oscylacje te mogłyby mieć znacznie większą amplitudę.

Zróżnicowanie czasu podania leku w układzie z przełączeniami pozwala zbadać wpływ na odpowiedź populacji różnych poziomów białek w komórkach, w chwili podania leku. Wczesne podanie leku pozwala na ograniczenie rozwoju choroby, dzięki utrzymaniu poziomu białka na niskim poziomie. Przy uwzględnieniu zarówno zróżnicowania wrażliwości komórki na obecność czynników regulatorowych, jak i poziomu białka w chwili podania leku, okazuje się, że podanie leku przy niższych poziomach białka, pozwala na osiągnięcie celu terapeutycznego w większej części populacji komórkowej.

Zakres zmienności wewnątrzpopulacyjnej ma bardzo duże znaczenie przy określaniu wartości dawki, która, przy minimalnej toksyczności, zapewni zrealizowanie celu terapeutycznego. Zróżnicowanie w zakresie stężenia czynników regulatorowych, umożliwiających aktywację procesu przełączenia stanu genu może wynikać z różnic między procesami, liniami komórkowymi lub populacjami. Populacja komórkowa o dużym zakresie wrażliwości na czynniki regulatorowe (czyli populacja o $n = 1$) posiada bardzo duże zróżnicowanie poziomu białka w chwili końcowej w układzie bez podania leku. Średni poziom białka w populacji może być zarówno wyższy, jak i niższy od odpowiedzi deterministycznej, w zależności od występujących sprzężeń w układzie oraz dawki. W modelu ze sprzężeniem ujemnym z szerokim zakresem wrażliwości na czynniki regulatorowe ($n = 1$), średni poziom białka przy niskich dawkach leku jest wyższy, natomiast przy wysokich dawkach jest niższy w stosunku do wyniku modelu deterministycznego. Podwyższenie poziomu białka wynika z losowej aktywacji drugiego genu, który w układzie deterministycznym, w domenie $\{1\}$ jest stale nieaktywny. Natomiast wraz ze wzrostem dawki leku, rozwiązanie deterministyczne przechodzi do domeny poniżej wartości progowej, gdzie obydwa geny są aktywne. Losowa dezaktywacja jednego genu w modelu stochastycznym powoduje obniżenie poziomu białka w stosunku do odpowiedzi deterministycznej. Z kolei w układzie ze sprzężeniem dodatnim obserwowana jest odwrotna zależność. Jest to ściśle powiązane ze strukturą zaproponowanego układu: jeśli w danym stanie w układzie deterministycznym są aktywne dwa geny, losowa dezaktywacja jednego z nich będzie obniżała poziom białka w układzie. Natomiast, jeśli w układzie deterministycznym w danym stanie jest aktywny tylko jeden gen, losowa, nawet chwilowa aktywacja drugiego, spowoduje podwyższenie poziomu białka w układzie.

Występowanie w systemie sprzężenia dodatniego często skutkuje pojawieniem się bistabilności, widocznej w wynikach eksperymentów biologicznych, jako różne typy odpowiedzi (np. [69, 70]). Podział populacji na dwie części, został wykazany poprzez współistnienie dwóch punktów stacjonarnych i jest również widoczny w wynikach modelu ze sprzężeniem dodatnim, zawierającym stochastyczne przełączenia. Powyższe wyniki pokazują, że aktywacja różnych typów odpowiedzi jest możliwa tylko w układach z przełączeniem silnie zależnym od stężenia czynnika regulatorowego (wysoka wartość n). Dla niskich wartości n przełączenia stanu genu mogą zachodzić również dla stężeń czynnika regulatorowego dalekich od wartości progowej. Baseny przyciągania wokół punktów stacjonarnych mają rozmyte granice, przez co trajektoria jest przyciągana przez obydwa punkty jednocześnie. Silne nakładanie się basenów przyciągania skutkuje częstymi zmianami domeny, a w konsekwencji trajektoria układu jest silnie zaszumiona i biegnie chaotycznie w okolicy granicy

między domenami.

Ze względu na procesy rozprzestrzeniania się leku w organizmie, jego oddziaływanie z innymi cząsteczkami, procesy rozpadu i wydalania z organizmu, założenie o stałym stężeniu leku w komórce jest bardzo dużym przybliżeniem. W wyniku spadku liczby cząsteczek leku, w rzeczywistych układach może nastąpić wzrost poziomu białka. W efekcie cel terapeutyczny, zdefiniowany jako utrzymanie poziomu białka poniżej założonej wartości, przestanie być realizowany. Przy założeniu, że celem jest utrzymanie niskiego poziomu białka przez pewien czas, można zaproponować kilka rodzajów terapii. Jedną z opcji jest wielokrotne podawanie niskich dawek leku (np. terapia metronomiczna), które pozwala utrzymać stężenie leku wewnątrz komórki na niskim, małotoksycznym poziomie, przy jednoczesnym utrzymaniu realizacji celu terapeutycznego. Ten typ terapii może również być modelowany przy zastosowaniu modeli z przełączeniami, gdzie sygnał przełączający jest okresową funkcją oznaczającą chwile podania leku. Takie podejście pozwala na uzyskanie ciekawych wyników już na prostych modelach dynamiki wewnątrzkomórkowej, co pokazałam w swojej publikacji [14].

Rozdział 5

Model modułu regulatorowego białka p53

Białko p53 nosi nazwę strażnika genomu, ze względu na kluczową rolę w aktywacji odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia DNA, powstałe w wyniku działania czynników zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkowych [27]. Ze względu na znaczenie białka p53, nad jego budową, funkcjami, modułem regulatorowym oraz aktywowanymi przez niego procesami, od wielu lat jest prowadzonych szereg badań, zarówno biologicznych, jak i symulacyjnych. Bazując na dostępnej wiedzy na temat budowy i funkcjonowania modułu regulatorowego białka p53 stworzyłam jego model, przy wykorzystaniu metodologii układów z przełączeniami. Podczas tworzenia modelu i dobierania wartości parametrów wykorzystałam dostępną wiedzę biologiczną oraz własne modele matematyczne białka p53. Ze względu na złożoną dynamikę modułu regulatorowego białka p53, opisujące go modele matematyczne są silnie nieliniowe (m.in. [22, 71]), a analiza ich zachowania zazwyczaj opiera się na stochastycznych lub deterministycznych przebiegach czasowych, otrzymanych metodami numerycznymi. W niniejszej rozprawie, dzięki zastosowaniu układów kawałkami liniowych, wykonałam dokładną analizę systemu, uwzględniającą m.in. analityczne rozwiązanie, tworzenie grafów tranzycji oraz wyznaczenie punktów stacjonarnych. Otrzymane wyniki symulacji odniosłam do znalezionych w literaturze wyników biologicznych oraz wyników symulacyjnych otrzymanych z wykorzystaniem innych modeli. Dzięki takiemu podejściu mogłam ocenić poprawność otrzymanych wyników, a także oszacować ich przydatność, w porównaniu do wyników modelowania nieliniowego.

Główna aktywność białka p53 polega na regulacji ekspresji genów związanych z szeregiem procesów, takich jak naprawa DNA, blokada cyklu komórkowego, starzenie się komórek czy apoptoza. W normalnych komórkach stężenie białka p53 jest utrzymywane na niskim poziomie dzięki szybkiej degradacji, indukowanej przez białko MDM2. Po pojawieniu się uszkodzeń materiału genetycznego poziom białka p53 gwałtownie wzrasta [72]. Nawet niewielkie uszkodzenia komórki wywołują akumulację p53, które następnie aktywuje procesy ich naprawy. Ponadto p53 aktywuje produkcję białek odpowiedzialnych za blokadę cyklu komórkowego, takich jak białko p21, 14-3-3-*sigma* czy GADD45. W rezultacie następuje tymczasowa blokada podziałów komórki, co zapobiega powielaniu się uszkodzonych komórek i daje czas na naprawę uszkodzeń [72]. Znaczące uszkodzenia komórki, które nie mogą być efektywnie naprawione, skutkują dalszą akumulacją białka p53, które aktywuje programowaną śmierć komórki (apoptozę) [73]. Oczywiście proces odpowiedzi komórkowej

na stress jest bardzo skomplikowany i zaangażowane są w niego liczne białka i inne związki (np. mikroRNA). W organizmie wielokomórkowym prawidłowe funkcjonowanie ścieżki apoptotycznej umożliwia m.in. likwidację komórek mutagennie zmienionych, posiadających potencjał nowotworowy.

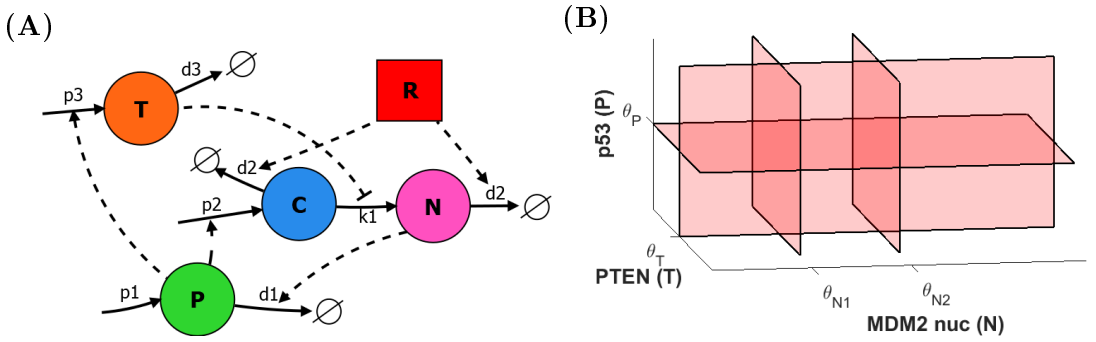
5.1 Opis modelu modułu regulatorowego białka p53

W zaproponowanym modelu modułu regulatorowego białka p53, uwzględniłam jedynie najważniejsze oddziaływania, kluczowe dla zachowania właściwej dynamiki układu. W stworzonym modelu uwzględnione są tylko dwie, główne pętle sprzężenia zwrotnego: jedna dodatnia i jedna ujemna oraz trzy białka: p53, MDM2 i PTEN. Ujemna pętla sprzężenia zawiera p53 oraz jego inhibitor – białko MDM2. p53 aktywuje ekspresję białka MDM2, które, jako ligaza E3 ubikwityny, reguluje proces przyłączenia cząsteczek ubikwityny do p53, co jest sygnałem do degradacji tego białka [74]. Dzięki działaniu pętli ujemnej, normalne, niepobudzone czynnikami stresowymi komórki, znajdują się w stanie równowagi, w którym jest stały, niski poziom białek p53 i PTEN oraz wysoki poziom MDM2 [75]. Druga pętla sprzężenia – sprzężenie dodatnie, pozwala natomiast na duży wzrost poziomu białka p53, jeżeli uszkodzenia materiału genetycznego w komórce nie zostaną dostatecznie szybko naprawione [76]. Sprzężenie dodatnie zawiera szereg białek, m. in. białko PTEN, którego gen jest aktywowany przez p53. PTEN dezaktywuje białko PIP3, które jest konieczne w dalszym procesie aktywacji białka MDM2. Wysoki poziom białka PTEN skutkuje blokadą transportu MDM2 z cytoplazmy do jądra komórkowego [72]. Białko p53, ze względu na swoją rolę czynnika transkrypcyjnego, jest zlokalizowane głównie w jądrze komórkowym, zatem ograniczenie transportu MDM2 do jądra pozwala na znaczne wydłużenie czasu półtrwania białka p53, poprzez zmniejszenie tempa jego degradacji. Efektem działania pętli dodatniej jest nagromadzenie białka p53 w jądrze komórkowym, co skutkuje wzrostem ilości białek proapoptotycznych (takich jak Bax), zależnych transkrypcyjnie od obecności białka p53. Uszkodzenia DNA indukują wiele zmian w komórce, m.in. aktywują gwałtowną degradację białka MDM2, co skutkuje wytrąceniem układu ze stanu równowagi. W stworzonym modelu uprościłam część oddziaływań, zostawiając jedynie najistotniejsze elementy: zależność transkrypcyjną białek PTEN i MDM2 od białka p53, aktywację degradacji p53 przez MDM2, zahamowanie transportu MDM2 do cytoplazmy pod wpływem wysokiego poziomu PTEN oraz aktywację degradacji MDM2 pod wpływem uszkodzeń komórki.

Powyższą sieć zależności zamodelowałam przy wykorzystaniu metodyki układów z przełączeniami. Wstępną wersję modelu kawałkami liniowego przedstawiłam w publikacjach [77, 78], gdzie porównałam jego wyniki z analogicznym modelem nieliniowym. W kolejnych pracach przedstawiłam ostateczną formę modelu wraz z parametrami oraz wykonaną analizę [79, 80]. Opublikowałam również, na nieco zmodyfikowanym modelu, wyniki symulacji populacji heterogenicznej w zależności od lokalizacji wartości progowych [81].

Stworzony model przedstawia działanie modułu regulatorowego białka p53 oraz ilustruje zachowanie się układu w odpowiedzi na stres. Model zawiera tylko najważniejsze białka tworzące sieć regulatorową białka p53, co pozwala, przy dużej prostocie modelu, odwzorować podstawową dynamikę układu. Model zawiera 4 zmienne:

- P – białko p53,
- M – cytoplazmatyczne białko MDM2,



Rysunek 5.1: Struktura modelu modułu regulatorowego białka p53; (A) Schemat oddziaływań w modelu; (B) Podział przestrzeni stanu przez wartości progowe

- N – jądrowe białko MDM2,
- T – białko PTEN

oraz wymuszenie R – stres, który powoduje powstanie uszkodzeń DNA i wzrost tempa degradacji MDM2, zarówno jądrowego, jak i cytoplazmatycznego. Schemat modelu jest przedstawiony na Rysunku 5.1A. Przedstawia on białka (zmienne modelu – w kółkach), procesy (strzałki z ciągłymi liniami, wraz z parametrami tempa reakcji) oraz oddziaływania białek na tempa procesów (oznaczone przez strzałki z przerywaną linią). Podukłady tworzące system są opisane liniowymi modelami uwzględniającymi procesy produkcji, degradacji oraz transportu. Równanie opisujące zmiany poziomu p53 jest następujące:

$$\frac{dP(t)}{dt} = p_1 - d_1^*(N(t))\,P(t). \tag{5.1}$$

Zmiana poziomu liczby cząsteczek białka p53 zależy od tempa produkcji (które jest stałe – pierwszy człon) oraz degradacji, zależnej od liczby jądrowego białka MDM2 (drugi człon).

$$\frac{dM(t)}{dt} = p_2^*(P(t)) - d_2\,(1+R)\,M(t) - k_1^*(T(t))\,M(t). \tag{5.2}$$

Zmiana poziomu białka MDM2 w cytoplazmie zależy od tempa produkcji (niskie lub wysokie w zależności od poziomu p53, równanie (5.2) – pierwszy człon), tempa degradacji (zwiększanej przez wymuszenie R – drugi człon równania (5.2)) oraz tempa transportu do jądra (wysokiego w warunkach normalnych lub niskiego dla wysokiego poziomu PTEN – trzeci człon równania (5.2)). Zmiana poziomu jądrowego MDM2 jest opisana następującym równaniem:

$$\frac{dN(t)}{dt} = k_1^*(T(t))\,M(t) - d_2\,(1+R)\,N(t). \tag{5.3}$$

Zmiana poziomu białka MDM2 w jądrze jest uzależniona od tempa importu MDM2 z cytoplazmy (pierwszy człon) oraz tempa degradacji, które podobnie jak tempo degradacji cytoplazmatycznego MDM2, jest zależne od stresu R (drugi człon). Natomiast tempo zmiany poziomu białka PTEN zależy jedynie od tempa jego produkcji, regulowanej przez p53 (pierwszy człon równania (5.4)), oraz degradacji, która jest stała (drugi człon równania (5.4)).

$$\frac{dT(t)}{dt} = p_3^*(P(t)) - d_3\,T(t). \tag{5.4}$$

Parametry modelu, których wartość zależy od stanu układu są oznaczone gwiazdką (*), a w nawiasach oznaczone są zmienne, które wpływają na wartość danego parametru. Aktywacja procesów zachodzi po przekroczeniu wartości progowej danego białka. W modelu istnieją 4 wartości progowe:

- θ_P – wartość progowa białka p53 – dzieli układ na domeny, w których produkcja białek MDM2 oraz PTEN jest niska lub wysoka,
- θ_T – wartość progowa białka PTEN – rozdziela przestrzeń stanu na domeny, w których transport MDM2 do cytoplazmy jest normalny (szybki) lub ograniczony (wolny),
- θ_{N1} i θ_{N2} – dwie wartości progowe jądrowego MDM2 – oddzielają stany układu, w których wartość tempa degradacji p53 jest niska, średnia lub wysoka. Dwie wartości progowe mają za zadanie lepiej oddawać stan komórki, w których w eksperymentach biologicznych obserwuje się niski, średni i wysoki poziom białka p53.

Podział przestrzeni stanu na 12 podprzestrzeni, przez zastosowane wartości progowe jest przedstawiony na Rysunku 5.1B. Ze względu na brak wartości progowej białka M, możliwe jest przedstawienie trójwymiarowej przestrzeni stanu, uwzględniającej jedynie zmienne posiadające wartości progowe (czyli P, N i T). W związku z istnieniem czterech wartości progowych w układzie występują cztery zmienne przełączające, wskazujące, czy dana zmienna jest powyżej czy poniżej danej wartości progowej (Z_P, Z_{N1}, Z_{N2}, Z_T), co można zapisać jako:

$$Z_P = \begin{cases} 0 & \text{dla} \quad P < \theta_P \\ 1 & \text{dla} \quad P \geqslant \theta_P, \end{cases} \tag{5.5}$$

$$Z_{N1} = \begin{cases} 0 & \text{dla} \quad N < \theta_{N1} \\ 1 & \text{dla} \quad N \geqslant \theta_{N1}, \end{cases} \tag{5.6}$$

$$Z_{N2} = \begin{cases} 0 & \text{dla} \quad N < \theta_{N2} \\ 1 & \text{dla} \quad N \geqslant \theta_{N2}, \end{cases} \tag{5.7}$$

$$Z_T = \begin{cases} 0 & \text{dla} \quad T < \theta_T \\ 1 & \text{dla} \quad T \geqslant \theta_T. \end{cases} \tag{5.8}$$

Wartości parametrów zależnych od stanu układu, można przedstawić poprzez wymnożenie parametrów reakcji przez binarne wartości zmiennych przełączających:

$$p_2^* = p_{20} + p_{21}\, Z_P, \tag{5.9}$$

$$p_3^* = p_{30} + p_{31}\, Z_P, \tag{5.10}$$

$$d_1^* = d_{10} + d_{11}\, Z_{N1} + d_{12}\, Z_{N2}, \tag{5.11}$$

$$k_1^* = k_{10} - k_{11}\, Z_T, \tag{5.12}$$

przy założeniu $k_{10} > k_{11}$. Wszystkie parametry składają się z sumy tempa zależnego od zmiennych przełączających oraz podstawowego tempa procesu, ponieważ procesy te mogą być aktywowane również przez inne białka (np. inne czynniki transkrypcyjne) i nawet przy niskich poziomach białek można zaobserwować występowanie danego procesu. Podobnie w równaniu (5.12) jest zakładane, że PTEN nie blokuje całkowicie transportu MDM2 do jądra, ale znacząco go hamuje. W każdej domenie zestaw parametrów modelu będzie miał różne wartości. Parametry oraz strukturę modelu dobrałam na podstawie wcześniejszych prac [77, 78] oraz udostępnionego mi modelu nieliniowego (przedstawionego w dalszej części rozprawy) tak, aby jak najlepiej oddawać zachowanie rzeczywistego układu, nie uwzględniając jednak żadnej specyficznej linii komórkowej. Wartości parametrów modelu, wartości progowe oraz wartości początkowe zmiennych są przedstawione w Tabeli 5.1.

Tabela 5.1: Wartości początkowe, parametry i progi w modelu PLDE białka p53

Parametr	Opis	Wartość	Jednostka
p_1	tempo produkcji P	8.8	1/s
p_{20}	tempo podstawowej produkcji M	2.4	1/s
p_{21}	tempo produkcji M indukowanej przez P	21.6	1/s
p_{30}	tempo podstawowej produkcji T	0.5172	1/s
p_{31}	tempo produkcji T indukowanej przez P	3.6204	1/s
d_{10}	tempo podstawowej degradacji P	$9.8395 \cdot 10^{-5}$	1/s
d_{11}	tempo podwyższonej degradacji P indukowanej przez N	$6.5435 \cdot 10^{-5}$	1/s
d_{12}	tempo wysokiej degradacji P indukowanej przez N	$9.8395 \cdot 10^{-5}$	1/s
d_2	tempo degradacji M i N	$1.375 \cdot 10^{-5}$	1/s
d_3	tempo degradacji T	$3 \cdot 10^{-5}$	1/s
k_{10}	tempo podstawowego transportu N	$1.5 \cdot 10^{-4}$	1/s
k_{11}	obniżenie tempa transportu N przez T	$1.4713 \cdot 10^{-4}$	1/s
θ_P	wartość progowa dla P	$4.5 \cdot 10^4$	cząsteczek
θ_{N1}	1. wartość progowa dla N	$4 \cdot 10^4$	cząsteczek
θ_{N2}	2. wartość progowa dla N	$8 \cdot 10^4$	cząsteczek
θ_T	wartość progowa dla T	10^5	cząsteczek
P_0	wartość początkowa P	$2.6858 \cdot 10^4$	cząsteczek
M_0	wartość początkowa M	$1.1166 \cdot 10^4$	cząsteczek
N_0	wartość początkowa N	$1.5438 \cdot 10^4$	cząsteczek
T_0	wartość początkowa T	$1.7240 \cdot 10^5$	cząsteczek

Przebiegi czasowe

Podczas wyboru układów kawałkami liniowych do opisu rzeczywistych systemów biologicznych rodzi się wątpliwość, czy są one zdolne do oddania skomplikowanej, nieliniowej dynamiki układu. W celu zaprezentowania efektywności modelowania z przełączeniami, wyniki symulacji otrzymanych z modelu kawałkami liniowego są zestawione z wynikami symulacji analogicznego, silnie nieliniowego modelu modułu regulatorowego białka p53 (autorstwa dra hab. Krzysztofa Puszyńskiego, prof. nzw. Pol. Śl.) będącym uproszeniem modelu [71]). Równania modelu są następujące:

$$\frac{dP(t)}{dt} = \widetilde{p_1} - \widetilde{d_1}\, N(t)^2\, P(t), \tag{5.13}$$

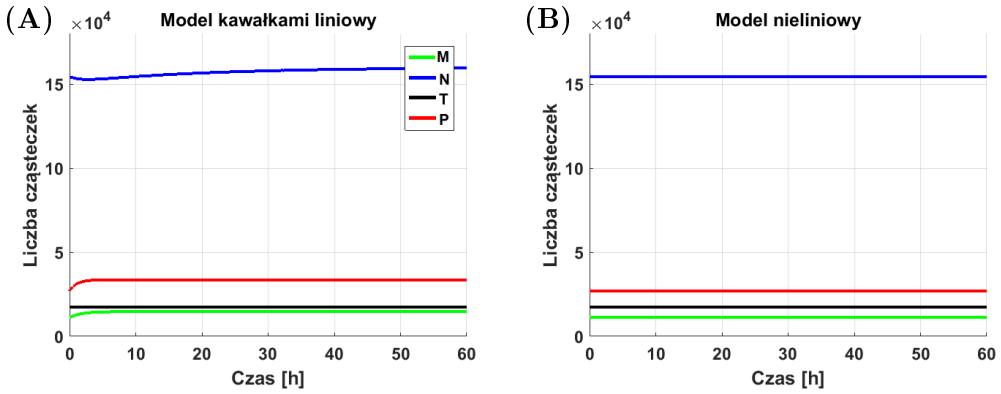
$$\frac{dM(t)}{dt} = \widetilde{p_2}\, \frac{P(t)^4}{P(t)^4 + \widetilde{k_2^4}} - \widetilde{d_2}\,(1+R)M(t) - \widetilde{k_1}\, \frac{\widetilde{k_3^2}}{\widetilde{k_3^2} + T(t)^2}\, M(t), \tag{5.14}$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = \widetilde{k_1}\, \frac{\widetilde{k_3^2}}{\widetilde{k_3^2} + T(t)^2}\, M(t) - \widetilde{d_2}\,(1+R)N(t), \tag{5.15}$$

$$\frac{dT(t)}{dt} = \widetilde{p_3}\, \frac{P(t)^4}{P(t)^4 + \widetilde{k_2^4}} - \widetilde{d_3}\, T(t), \tag{5.16}$$

Tabela 5.2: Wartości parametrów w nieliniowym modelu białka p53

Parametr	Opis	Wartość	Jednostka
$\widetilde{p_1}$	tempo produkcji P	8.8	$1/s$
$\widetilde{p_2}$	tempo produkcji M	440	$1/s$
$\widetilde{p_3}$	tempo produkcji T	100	$1/s$
$\widetilde{d_1}$	tempo degradacji P	$1.375 \cdot 10^{-14}$	$1/s$
$\widetilde{d_2}$	tempo degradacji M i N	$1.375 \cdot 10^{-5}$	$1/s$
$\widetilde{d_3}$	tempo degradacji T	$3 \cdot 10^{-5}$	$1/s$
$\widetilde{k_1}$	tempo transportu N	$1.925 \cdot 10^{-4}$	$1/s$
$\widetilde{k_2}$	stała w równaniu na produkcję M i T	$1 \cdot 10^{-5}$	cząsteczek^4
$\widetilde{k_3}$	stała w równaniu na transport T	$1.5 \cdot 10^{-5}$	cząsteczek^2

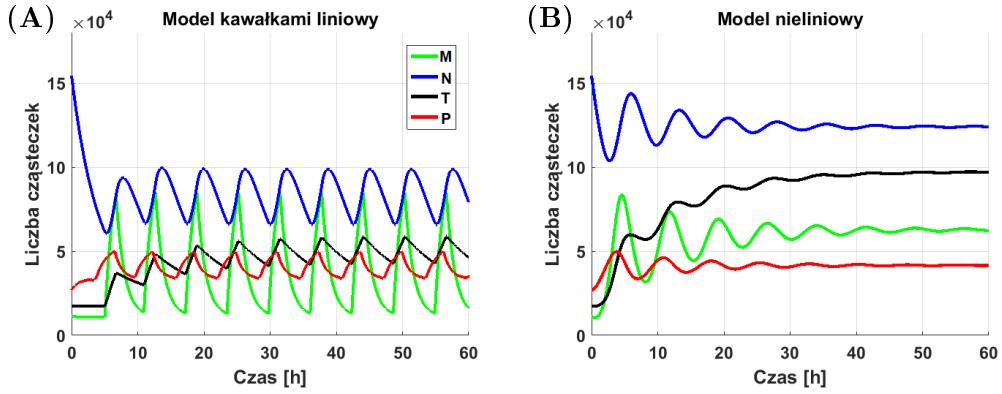


Rysunek 5.2: Porównanie przebiegów czasowych otrzymanych za pomocą modelu kawałkami liniowego i nieliniowego w systemie bez wymuszenia; (A) Model kawałkami liniowy; (B) Modelu nieliniowy.

gdzie człony równań oznaczające konkretne procesy są w takiej samej kolejności jak w analogicznych równaniach modelu kawałkami liniowego (równania (5.1)-(5.4)). Parametry występujące w modelu nieliniowym zostały oznaczone tyldą (np. $\widetilde{p_1}$), aby odróżnić je od parametrów modelu kawałkami liniowego, a ich wartości są przedstawione w Tabeli 5.2.

W warunkach bez podania czynnika stresowego ($R = 0\,a.u.$) w przypadku obydwu modeli widoczny jest wysoki poziom jądrowego MDM2 i niski poziom pozostałych białek. Wartości początkowe są takie same w obydwóch modelach i zostały dobrane poprzez numeryczne sprawdzenie lokalizacji punktu stacjonarnego w modelu nieliniowym. W przypadku modelu kawałkami liniowego, w początkowych chwilach symulacji widoczne są niewielkie zmiany poziomu białek, wynikające z niewielkiej różnicy między punktem równowagi w układzie kawałkami liniowym (Rysunek 5.2A) i nieliniowym (Rysunek 5.2B), będącej efektem doboru parametrów.

Przy średnich uszkodzeniach materiału genetycznego, w eksperymentach biologicznych obserwuje się oscylacje poziomu białka p53, wywołane działaniem ujemnej pętli sprzężenia [82]. W przypadku modelu nieliniowego, po zadziałaniu stresem o wartości $R = 4\,a.u.$, obserwuje się gasnące oscylacje (Rysunek 5.3B). Natomiast w przypadku modelu kawałkami liniowego oscylacje są stałe (Rysunek 5.3B). W obu przypadkach nie obserwuje się powrotu

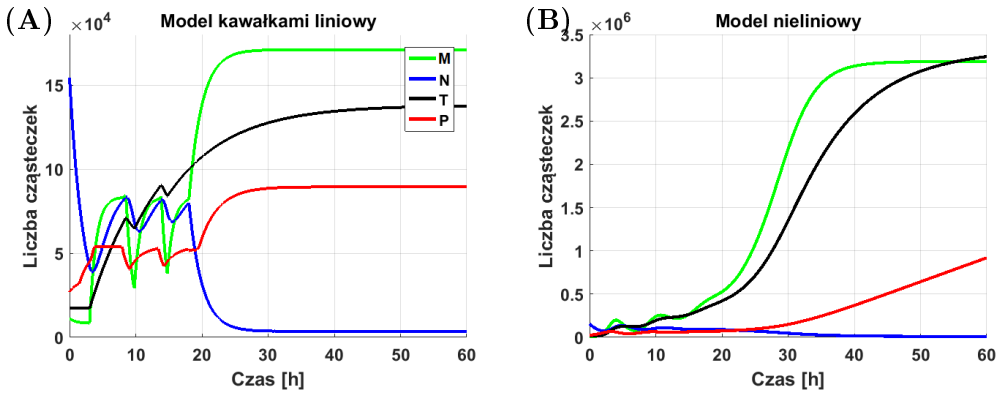


Rysunek 5.3: Porównanie przebiegów czasowych otrzymanych za pomocą modelu kawałkami liniowego i nieliniowego w systemie z wymuszeniem $R = 4\,a.u.$; (A) Model kawałkami liniowy; (B) Model nieliniowy

do stanu początkowego, ponieważ stres jest modelowany jako stała zmiana parametru. Jeśli modele zostałyby rozbudowane o równanie opisujące poziom uszkodzeń DNA, możliwe byłoby obserwowanie naprawy DNA oraz powrotu do stanu sprzed działania stresu. Jednakże element ten nie jest istotny w kontekście badania dynamiki modułu regulatorowego białka p53, dlatego został pominięty w niniejszych modelach.

Wysokie dawki czynnika stresogennego powodują poważne uszkodzenia materiału genetycznego, które nie mogą być efektywnie naprawione, co skutkuje aktywacją programowanej śmierci komórki. W pierwszych chwilach po zadziałaniu stresu występują oscylacje poziomu białka p53. W tym czasie podjęte są próby naprawy materiału genetycznego. Jeśli uszkodzenia nie zostaną naprawione, następuje nagromadzenie białka PTEN, które skutkuje blokadą białka MDM2 w cytoplazmie, przez co gwałtownie wzrasta poziom białka p53, które zlokalizowane jest głównie w jądrze. Utrzymywanie stale wysokiego poziomu białka p53 pozwala na dalszą produkcję białek związanych z aktywacją apoptozy, a także bezpośrednie oddziaływanie białka p53 na błonie mitochondrialnej [83]. W obu modelach obserwuje się oscylacje w początkowej fazie odpowiedzi na stres, a następnie dalszy wzrost poziomu białka p53. W przypadku modelu nieliniowego widoczny jest ogromny wzrost poziomu białka PTEN oraz MDM2 w cytoplazmie, a także brak nasycenia poziomu białka p53 w analizowanym odcinku czasu (Rysunek 5.4B). Tak wysokie liczności białka w komórce najprawdopodobniej nie są możliwe do osiągnięcia, ze względu na biologiczne ograniczenia komórki i są artefaktem nieliniowego modelowania procesów bez warunku apoptozy. W przypadku modelu kawałkami liniowego widoczny jest wzrost poziomu białka p53 (Rysunek 5.4A), co odpowiada aktywacji apoptozy w komórkach. Poziom białka p53 po około 30 godzinach stabilizuje się na poziomie równym 3-krotności poziomu białka w stanie sprzed wymuszenia, co jest zgodne z wynikami eksperymentalnymi opublikowanym w [84]. W tym przypadku, przy tak dużym uproszczeniu układów, zastosowanie modelowania kawałkami liniowego pozwala na ograniczenie poziomów białek i lepsze dopasowanie wyników symulacyjnych.

Zmieniając wartość stresu R można badać wpływ różnego poziomu uszkodzeń DNA na odpowiedź komórki. Już niski poziom stresu wywołuje oscylacje poziomu białka, ale okres tych oscylacji jest długi, a średni poziom białka w czasie jest niewystarczający do wywołania apoptozy (Rysunek 5.5, pierwszy wiersz). Długość okresu oscylacji p53 w mo-



Rysunek 5.4: Porównanie przebiegów czasowych w modelu kawałkami liniowym i nieliniowym w systemie z wymuszeniem $R = 9\,a.u.$; (A) Przebiegi czasowe modelu kawałkami liniowego; (B) Przebiegi czasowe modelu nieliniowego

delowanym systemie zależy od dawki. W przypadku modelu nieliniowego (Rysunek 5.5, pierwsza kolumna), długość okresu dla analizowanych poziomów stresu zawiera się w przedziale 6.7 – 8.5 godziny, natomiast w przypadku modelu z przełączeniami ten rozrzut jest nieznacznie większy, ale przyjmuje niższe wartości: 5.2 – 8.2 godziny (Rysunek 5.5, druga kolumna). Podobne długości okresu obserwuje się również w wynikach eksperymentów biologicznych [85]. Dokładne wartości są zależne zarówno od linii komórkowej, jak i rodzaju wymuszenia. Na podstawie wyników symulacji modelu można zauważyć, że wzrost poziomu stresu powoduje spadek długości okresu oscylacji w komórkach (Rysunek 5.5), co jest zgodnie z obserwacjami biologicznymi na pojedynczych komórkach (badania mikroskopowe prowadzone na komórkach z znakowanym fluorescencyjnie białkiem p53 [74]).

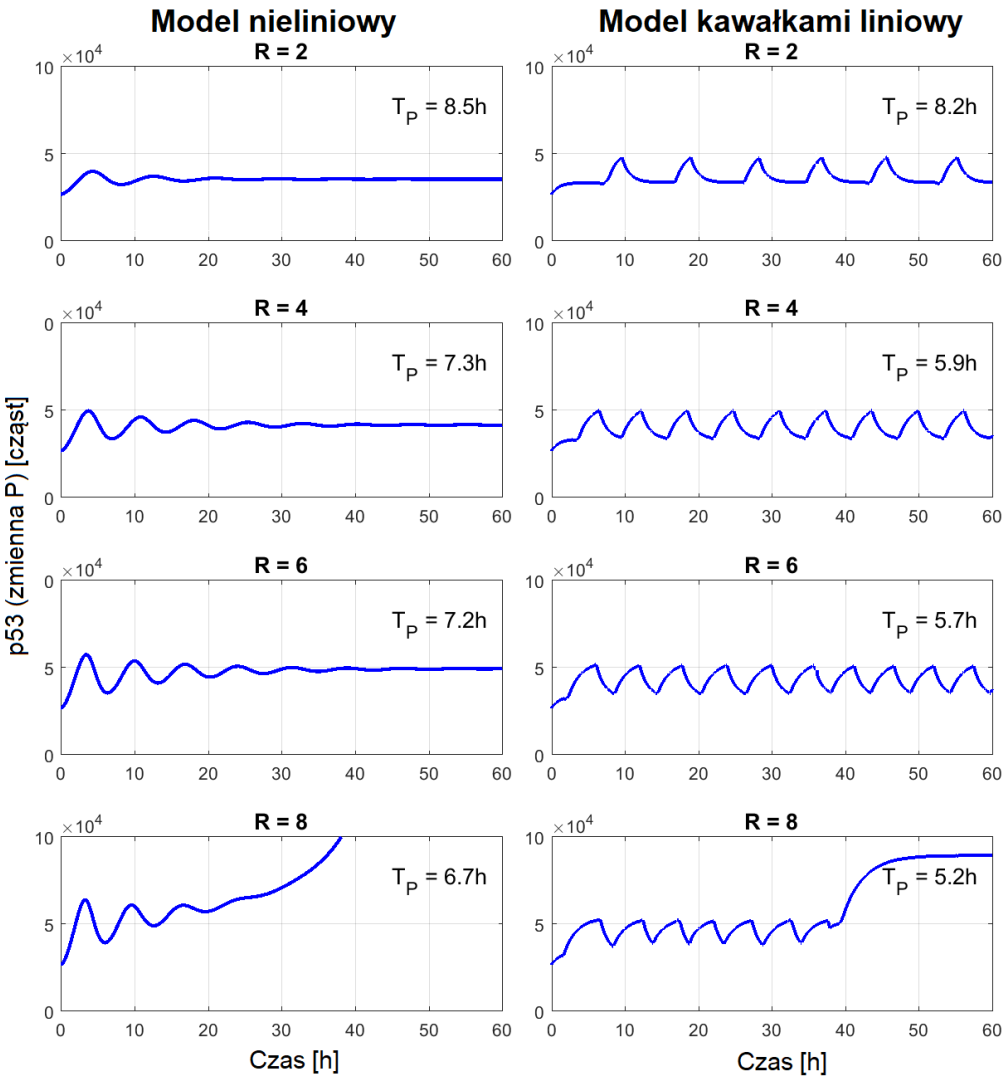
5.2 Rozwiązanie analityczne modelu szlaku regulatorowego białka p53

W każdej domenie regulatorowej model szlaku regulatorowego białka p53 ma inne właściwości ze względu na różne wartości parametrów modelu. Jednakże struktura modelu pozostaje taka sama, a rozwiązanie analityczne dla każdej domeny różni się jedynie wartościami parametrów, zmieniających swoją wartość w momencie zmiany domeny.

5.2.1 Wyznaczenie rozwiązań analitycznych w poszczególnych domenach

W poszczególnych domenach wartości parametrów, zależnych od stanu układu (czyli p_2^*, p_3^*, d_1^* i k_1^*) są stałe, dlatego możliwe jest wyznaczenie rozwiązań analitycznych. Poziom białka p53 oraz PTEN zależy wyłącznie od procesu produkcji oraz degradacji, zatem rozwiązanie czasowe można wyznaczyć analogicznie jak w modelu produkcji mRNA w sekcji 4.2.1. Rozwiązanie analityczne równania opisującego poziom białka p53 jest następujące:

$$P(t) = \frac{p_1}{d_1^*} + \left(P_0 - \frac{p_1}{d_1^*}\right) e^{-d_1^* t}. \tag{5.17}$$



Rysunek 5.5: Przebiegi czasowe poziomu białka p53 przy różnych wartościach stresu R (pierwsza kolumna – model nieliniowy; druga kolumna – model kawałkami liniowy; T_P - długość okresu)

Z kolei rozwiązanie analityczne poziomu białka PTEN jest opisane równaniem:

$$T(t) = \frac{p_3^*}{d_3} + \left(T_0 - \frac{p_3^*}{d_3}\right)e^{-d_3 t}. \tag{5.18}$$

W przypadku równania opisującego poziom cytoplazmatycznego MDM2 należy również uwzględnić spodek poziomu białka w wyniku transportu MDM2 do cytoplazmy, jednak ogólna forma równania jest taka sama:

$$M(t) = \frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*} + \left(M_0 - \frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*}\right)e^{-(d_2(1+R)+k_1^*)t}. \tag{5.19}$$

Natomiast równanie opisujące poziom jądrowego białka MDM2 ma analogiczną strukturę do równania opisującego zmiany poziomu białka w modelu produkcji białka (sekcja 4.2.2). Najpierw należy stworzyć równanie pochodnej zmiennej N, podając wprost wzór opisujący przebieg czasowy $M(t)$, poprzez podstawienie równania (5.19) do równania (5.2):

$$\frac{dN(t)}{dt} = k_1^*\left(\frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*} + \left(M_0 - \frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*}\right)e^{-(d_2(1+R)+k_1^*)t}\right) - d_2(1+R)N(t), \tag{5.20}$$

które po wprowadzeniu stałej

$$C_1 = M_0 - \frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*} \tag{5.21}$$

i po przekształceniach przyjmuje następującą formę:

$$\frac{dN(t)}{dt} + d_2(1+R)N(t) = k_1^*\left(\frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*} + C_1 e^{-(d_2(1+R)+k_1^*)t}\right). \tag{5.22}$$

Rozwiązanie tego równania można uzyskać poprzez rozwiązanie równania jednorodnego i uzmiennienie stałej. Rozwiązanie równania jednorodnego ma następującą postać:

$$N(t) = C_2 e^{-d_2(1+R)t}, \tag{5.23}$$

a po zróżniczkowaniu ma następująca formę:

$$\frac{dN(t)}{dt} = \frac{dC_2(t)}{dt}e^{-d_2(1+R)t} - C_2(t)d_2(1+R)e^{-d_2(1+R)t}. \tag{5.24}$$

Po podstawieniu do równania (5.22) i zredukowaniu otrzymuje się równanie na pochodną:

$$\frac{dC_2(t)}{dt} = k_1^*\left(\frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*} + C_1 e^{-(d_2(1+R)+k_1^*)t}\right)e^{d_2(1+R)t}, \tag{5.25}$$

którą można wyliczyć przez całkowanie:

$$C_2(t) = \frac{k_1^* p_2^*}{d_2(1+R)(d_2(1+R)+k_1^*)}e^{d_2(1+R)t} - C_1 e^{-k_1^* t} + C_3. \tag{5.26}$$

Po podstawieniu powyższej funkcji do równania (5.23) otrzymuje się równanie w postaci czasowej

$$N(t) = \frac{k_1^* p_2^*}{d_2(1+R)(d_2(1+R)+k_1^*)} - C_1 e^{-(d_2(1+R)+k_1^*)t} + C_3 e^{-d_2(1+R)t}, \tag{5.27}$$

zawierające stałą C_3, którą można wyznaczyć poprzez znalezienie rozwiązania szczególnego dla $t = 0$:

$$C_3 = N_0 - \frac{k_1^* p_2^*}{d_2(1+R)(d_2(1+R)+k_1^*)} + C_1, \tag{5.28}$$

gdzie po podstawieniu formuły opisującej C_1, wstawieniu do równania czasowego i uproszczeniu otrzymuje się pełne rozwiązanie analityczne poziomu jądrowego białka MDM2:

$$\begin{aligned} N(t) \;=\; & \frac{k_1^* p_2^*}{d_2(1+R)(d_2(1+R)+k_1^*)} - \left(M_0 - \frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*}\right)e^{-(d_2(1+R)+k_1^*)t} + \\ & + \left(N_0 + M_0 - \frac{p_2^*}{d_2(1+R)}\right)e^{-d_2(1+R)t}. \end{aligned} \tag{5.29}$$

5.2.2 Określenie wartości punktów docelowych

Na podstawie rozwiązania analitycznego, dla każdego podukładu można wyznaczyć punkt docelowy, do którego będą zmierzały trajektorie. Ogólne wzory, opisujące wartości punktów docelowych w dowolnych domenach, są następujące:

$$\lim_{t\to\infty} P(t) = \frac{p_1}{d_1^*}, \tag{5.30}$$

$$\lim_{t\to\infty} M(t) = \frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*}, \tag{5.31}$$

$$\lim_{t\to\infty} N(t) = \frac{k_1^* p_2^*}{d_2(1+R)(d_2(1+R)+k_1^*)}, \tag{5.32}$$

$$\lim_{t\to\infty} T(t) = \frac{p_3^*}{d_3}. \tag{5.33}$$

Jak widać w powyższych równaniach, ze względu na występowanie w nich parametrów z $*$, których wartości zależą od domeny, w której znajduje się układ, położenie punktów docelowych dla trajektorii również zależy od domeny, w której rozważana trajektoria się znajduje. To, czy punkt docelowy danej domeny będzie zwyczajnym punktem stacjonarnym, zależy od położenia wartości progowych, ponieważ natrafienie na granicę przez trajektorię startującą z danej domeny, spowoduje przejście do innej domeny i zmianę zachowania układu.

5.2.3 Wyznaczenie czasu przełączenia

Równania czasowe opisujące poziom białka p53 (P) oraz PTEN (T) są stosunkowo proste, dlatego możliwe jest wyznaczenie czasu, w jakich układ startujący z danych warunków początkowych osiągnie wartość progową (oczywiście o ile w ogóle osiągnie wartość progową). Czas przełączenia dla zmiennej P (oznaczony t_{Ps}) wyliczyłam poprzez przyrównanie równania (5.17) do wartości progowej i zlogarytmowanie:

$$\theta_P = \frac{p_1}{d_1^*} + \left(P_0 - \frac{p_1}{d_1^*}\right) e^{-d_1^* t_{Ps}}, \tag{5.34}$$

$$\theta_P - \frac{p_1}{d_1^*} = \left(P_0 - \frac{p_1}{d_1^*}\right) e^{-d_1^* t_{Ps}}, \tag{5.35}$$

$$ln\left(\frac{\theta_P - \frac{p_1}{d_1^*}}{P_0 - \frac{p_1}{d_1^*}}\right) = -d_1^* t_{Ps}, \tag{5.36}$$

zatem czas ten jest równy:

$$t_{Ps} = \frac{1}{d_1^*} ln\left(\frac{P_0\, d_1^* - p_1}{\theta_P\, d_1^* - p_1}\right). \tag{5.37}$$

W zależności od warunków początkowych oraz pozostałych parametrów, obserwuje się różne zachowanie układu:

- $P_0 = p_1/d_1^*$ – układ jest w stanie równowagi, a więc w punkcie docelowym,
- $\theta_P = p_1/d_1^*$ – punkt docelowy jest zlokalizowany w wartości progowej, zatem trajektoria dojdzie do wartości progowej, ale jej nie przekroczy i nie nastąpi przełączenie,

- $P_0 > \theta_P \wedge p_1/d_1^* < \theta_P$ lub $P_0 < \theta_P \wedge p_1/d_1^* > \theta_P$ – trajektoria natrafi na wartość progową w czasie określonym wzorem (5.37),
- $P_0 > \theta_P \wedge p_1/d_1^* > \theta_P$ lub $P_0 < \theta_P \wedge p_1/d_1^* < \theta_P$ – układ będzie dążył do punktu docelowego w danej domenie, nie natrafi na wartość progową θ_P.

Analogicznie wyznaczyłam czas przełączenia dla wartości progowej θ_T, ponieważ równanie czasowe białka T (równanie (5.18)) ma podobną strukturę jak równianie opisujące poziom białka P. Równanie opisujące czas przełączenia t_{Ts} jest następujące:

$$t_{Ts} = \frac{1}{d_3} ln\left(\frac{T_0\, d_3 - p_3^*}{\theta_T\, d_3 - p_3^*}\right). \tag{5.38}$$

Również dla tego równania można wyznaczyć zależności wartości parametrów, dla których będzie możliwe wyznaczenie czasu przełączenia:

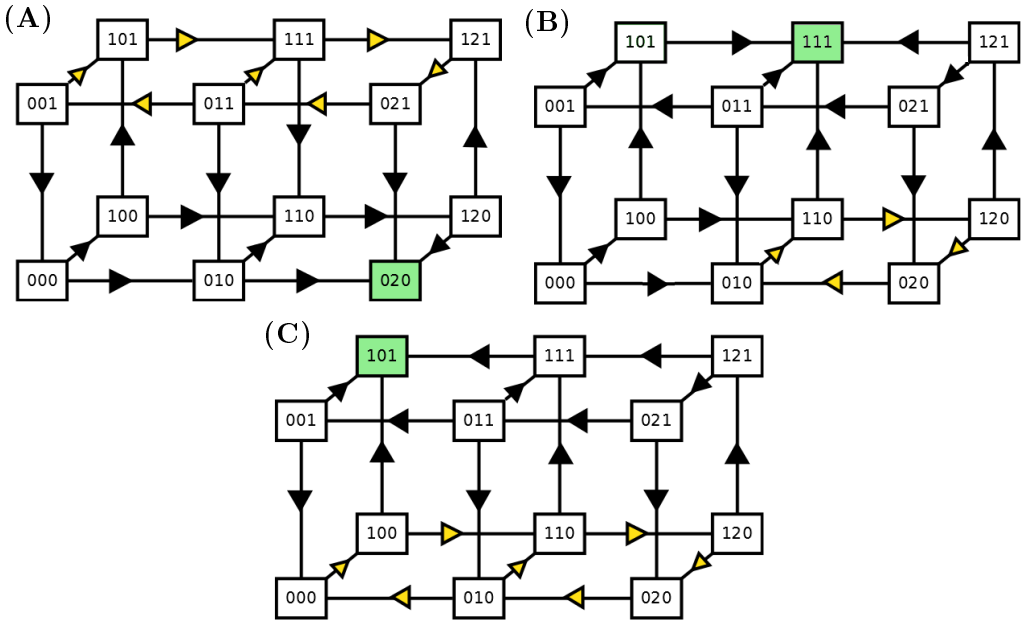
- $T_0 = p_3^*/d_3$ – układ jest w stanie równowagi, a więc w punkcie docelowym trajektorii,
- $\theta_T = p_3^*/d_3$ – punkt docelowy jest zlokalizowany na wartości progowej, zatem trajektoria osiągnie wartość progową, ale nie nastąpi przełączenie,
- $T_0 > \theta_T \wedge p_3^*/d_3 < \theta_T$ lub $T_0 < \theta_T \wedge p_3^*/d_3 > \theta_T$ – trajektoria natrafi na wartość progową w czasie określonym wzorem 5.38,
- $T_0 > \theta_T \wedge p_3^*/d_3 > \theta_T$ lub $T_0 < \theta_T \wedge p_3^*/d_3 < \theta_T$ – układ będzie dążył do punktu docelowego w danej domenie, nie natrafi na wartość progową θ_T.

W układzie występują również dwie wartości progowe dla jądrowej formy białka MDM2, której poziom jest zależny od poziomu jego cytoplazmatycznej formy. Ze względu na duży stopnień skomplikowania rozwiązania czasowego dla jądrowego białka MDM2 (równanie (5.29)), nie ma możliwości dokładnego wyznaczenia czasu osiągnięcia wartości progowych θ_{N1} i θ_{N2}.

5.3 Graf tranzycji modelu modułu białka p53 dla różnych wymuszeń

Grafy tranzycji pozwalają na wizualizację deterministycznego zachowania układu poprzez schematyczne przedstawienie przejść pomiędzy domenami. Analiza niniejszego układu została już przedstawiona w artykule [79], gdzie prezentowanie były również schematy grafów tranzycji. Grafy tranzycji mogą być wykorzystane podczas wyliczania punktów stacjonarnych, zwyczajnych i osobliwych, ponieważ pokazują, w których domenach występują punkty RSP oraz pomiędzy którymi domenami mogą występować oscylacje.

Każda domena może być jednoznacznie opisana przez wektor trzech wartości $B = \{Z_P, Z_N, Z_T\}$, gdzie Z_P, Z_N oraz Z_T przyjmują wartości oznaczające położenie danej zmiennej powyżej lub poniżej wartości progowej. Ze względu na występowanie dwóch progów dla zmiennej N, zmienna Z_N może mieć wartość 0, 1 lub 2. W przypadku zmiennych Z_P oraz Z_T możliwe są tylko wartości 0 i 1. Przykładowo domena $\{011\}$ oznacza podprzestrzeń stanu, gdzie $P < \theta_P$, $\theta_{N1} < N < \theta_{N2}$ i $T > \theta_T$.



Rysunek 5.6: Graf tranzycji dla modelu z różnymi dawkami wymuszenia [79]; (A) $R = 0\,a.u.$ (B) $R = 1.5\,a.u.$ (C) $R = 9\,a.u.$

W procesie tworzenia grafu przejść dla modelu modułu regulatorowego białka p53 wykorzystywane są dane o punktach docelowych trajektorii dla poszczególnych domen (równania (5.30) - (5.33)). Lokalizacja punktów docelowych domeny niesie informacje o kierunku zmian poziomów białek w domenie — czy i w stronę których granic trajektoria się przesuwa — co pozwala określić kierunek przejść pomiędzy domenami. Dla różnych wartości stresu R zmieniają się kierunki oddziaływań niektórych łuków w grafie, co oddaje zmianę zachowania układu pod wpływem stresu.

Graf tranzycji dla układu bez wymuszenia jest przedstawiony na Rysunku 5.6A. Na grafie widoczne jest, że żaden łuk nie jest wyprowadzony z domeny {020}, co sugeruje, że jest zlokalizowany w niej zwyczajny punkt stacjonarny. W tej domenie poziomy białek p53 i PTEN są niskie, a poziom jądrowego MDM2 jest wysoki. Wysoki poziom jądrowego MDM2 wynika z wolnego tempa degradacji oraz szybkiego transportu MDM2 z cytoplazmy do jądra, co pozwala na jego akumulację w tym kompartmencie. Wysoki poziom MDM2 w jądrze powoduje bardzo szybką degradację p53, skutkującą jego niskim poziomem, obserwowanym w komórkach w stanie natywnym. Ponadto na grafie widoczne są cykle pomiędzy domenami {011}, {111}, {121}, {021} oraz {011}, {001}, {101}, {111}, {121}, {021}, co może powodować występowanie oscylacji, w przypadku wystąpienia w układzie wysokiego poziomu białka PTEN.

Pod wpływem wymuszenia o niskiej wartości ($R = 1.5\,a.u.$) punkty docelowe w domenach zmieniają swoje położenie, a w efekcie również zmienia się graf przejścia (Rysunek 5.6B). W układzie następuje zmiana kierunku łuków tak, że zmierzają do do domeny {111}, w której poziom białka p53 jest podwyższony. Stres zwiększa degradację MDM2, przez co jego czas półtrwania jest krótszy. Niższy poziom MDM2 skutkuje zmniejszeniem tempa degradacji p53. W układzie akumuluje się białko p53, co powoduje zwiększenie produkcji cytoplazmatycznego MDM2 oraz PTEN – białka te występują na wysokim poziomie. Niski

poziom jądrowego MDM2 jest również skutkiem częściowej blokady transportu, aktywowanej przez wysoki poziom białka PTEN. Jednocześnie w układzie występuje cykl pomiędzy domenami: {010}, {110}, {120}, {020}, co może świadczyć o występowaniu oscylacji pomiędzy tymi domenami.

Dla wysokich dawek wymuszenia przejścia między domenami ulegają dalszym zmianom (Rysunek 5.6C). Wraz ze wzrostem stresu ($R = 9\,a.u.$) następuje przesunięcie punktu stacjonarnego do domeny {101}, co odpowiada wysokiemu poziomowi białka p53 i PTEN oraz niskiemu poziomowi jądrowego MDM2. Białko MDM2 w jądrze jest na bardzo niskim poziomie, wywołanym zarówno przez indukowaną stresem degradację, jak i spowolnienie transportu do jądra przez wysoki poziom białka PTEN. Niski poziom jądrowego MDM2 skutkuje niskim tempem degradacji p53. Wysoki poziom białka p53, w odpowiedzi na dużą liczbę uszkodzeń materiału genetycznego, jest obserwowany w eksperymentach biologicznych, gdzie np. pod wpływem doksycykliny następuje nagromadzenie tego białka i aktywacja procesów związanych z apoptozą [86]. Jednocześnie na grafie obserwujemy wystąpienie cyklu pomiędzy domenami {010}, {110}, {120}, {020} oraz cyklu pomiędzy domenami {010}, {000}, {100}, {110}, {120}, {020}. Cykle te mogą odpowiadać oscylacjom poziomów MDM2 oraz p53, przy jednocześnie niskim poziomie białka PTEN, co sugeruje, że komórki nowotworowe z uszkodzoną produkcją PTEN (np. MCF7) mimo uszkodzeń nie aktywują apoptozy, tylko nadal proliferują [71].

Stworzenie grafu przejść obrazuje ogólny kierunek zmian poziomów białka w systemie. Tym nie mniej, w przedstawionym przeze mnie, niezbyt rozbudowanym układzie widoczne jest, jak bardzo ograniczone jest wnioskowanie o dynamice zmian. Graf tranzycji zawiera informacje o lokalizacji zwyczajnych punktów stacjonarnych, gdyż są to domeny, z których nie są wyprowadzone żadne łuki. Jednakże lokalizacja punktu stacjonarnego w danej domenie nie oznacza, że wszystkie trajektorie z danej domeny będą się w tej domenie stabilizowały. Trajektoria układu, zmierzając do punktu docelowego, może natrafić na wartość progową, co spowoduje przejście do innej domeny.

Ponadto pole trajektorii w domenie może mieć bardzo zróżnicowany rozkład trajektorii, przez co kierunek ich zmian będzie zależny od warunku początkowego. Przykładowo ,startując z domeny {000}, w układzie bez wymuszenia może wzrosnąć poziom białka p53 lub MDM2 powyżej odpowiedniej wartości progowej. Do której domeny przejdzie trajektoria, zależy od warunku początkowego. Istnienie zamkniętych sekwencji między domenami również nie jest wystarczającym argumentem, aby wnioskować o występowaniu stabilnych cykli granicznych w układzie. Przykładowo, startując z domeny {020} w układzie z wymuszeniem $R = 1.5\,a.u.$, trajektoria hipotetycznie może krążyć między domenami. Jednak może się okazać, że po przejściu do domeny {110}, tempo zmian w kierunku domeny {111} jest znacznie większe, niż w kierunku domeny {120}, przez co odpowiedź układu będzie stabilizowała się w punkcie stacjonarnym w domenie {111}.

Grafy tranzycji pełnią rolę pomocniczą w analizie układów z przełączeniami. Pełniejsza analiza, jak np. lokalizacja cykli granicznych, jest możliwa poprzez analityczne wyliczenie osobliwych punktów stacjonarnych, co zostanie przedstawione w następnej sekcji.

Tabela 5.3: Wartości poziomów białek w punktach RSP

Stres (R)	Domena	P_s	M_s	N_s	T_s
0 a.u.	{020}	33 559	14 656	159 888	17 240
1.5 a.u.	{111}	53 714	644 381	53 800	137 920
9 a.u.	{101}	89 435	170 976	3 568	137 920

5.4 Analiza punktów stacjonarnych modelu szlaku regulatorowego białka p53

W zależności od wartości wymuszenia w modelu modułu regulatorowego białka p53 występują znaczne różnice w dynamice układu. W celu dokładnego poznania odpowiedzi układu na dane wymuszenie, w układach kawałkami liniowych można wyznaczyć punkty stacjonarne zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 3.3. Wyznaczenie punktów stacjonarnych pozwoli na określenie rodzaju odpowiedzi układu na zadane wymuszenie — wyznaczenie poziomu białka w stanie ustalonym oraz określenie położenia w przestrzeni stanu punktu, wokół którego występują oscylacje.

Aby w pełni scharakteryzować zachowanie układu teoretycznie można w sposób analityczny wyznaczyć baseny przyciągania wokół punktów stacjonarnych. Jednak badany model jest zbyt skomplikowany, aby wyznaczyć czasy przełączeń i pełne rozwiązanie analityczne modelu, co byłoby konieczne do zbadania basenów przyciągania. Alternatywnym rozwiązaniem może być numeryczne przeszukanie przestrzeni stanów i sprawdzenie odpowiedzi dla poszczególnych warunków początkowych, co jednak byłoby zaprzeczeniem podejścia analitycznego.

5.4.1 Zwyczajne punkty stacjonarne

Wyznaczenie dokładnej lokalizacji zwyczajnych punktów stacjonarnych pozwala na określenie poziomów białek w stanie ustalonym. Na podstawie grafu tranzycji widoczne jest, w których domenach znajdują się punkty równowagi, jednak nie jest określona ich dokładna lokalizacja w przestrzeni. Jeśli dla układu stworzony został graf przejścia, wyliczenie punktu RSP można wykonać tylko dla domeny, do której zbiegają się trajektorie. Jeśli wykonuje się analizę układu od podstaw, należy wyliczyć położenie punktów docelowych we wszystkich domenach, a następnie sprawdzić, czy dany punkt jest zlokalizowany w obrębie analizowanej domeny. Do wyznaczenia punktów docelowych wykorzystałam wzory (5.30) - (5.33).

W analizowanym układzie zwyczajne punkty stacjonarne mogą występować tylko w 3 domenach w zależności od wymuszenia R. Dokładne wartości poziomów białek w stanie stacjonarnym dla analizowanych wartości wymuszenia są przedstawione w Tabeli 5.3. Dzięki zastosowaniu układów kawałkami liniowych do modelowania niniejszego systemu, możliwe jest dokładne wyznaczenie nie tylko lokalizacji punktów stacjonarnych, ale również wyznaczenie analitycznie zakresu stresu, dla którego punkty stacjonarne są zlokalizowane w danych domenach. W obliczeniach należy sprawdzić, dla jakich wartości parametru R, punkt docelowy (opisany równaniami (5.30) - (5.33)) będzie zlokalizowany w obrębie danej domeny. Zakresy wymuszeń, dla jakich punkty występują w odpowiednich domenach, są następujące:

- w domenie $\{020\}$ dla $R \in [0, 0.8635)\, a.u.$,
- w domenie $\{111\}$ dla $R \in (1.0322, 1.9154)\, a.u.$,
- w domenie $\{101\}$ dla $R \in (1.9154, +\infty)\, a.u.$

Punkt w domenie $\{020\}$ występuje tylko dla niskich wartości stresu ($R \leqslant 0.8635\, a.u.$), które nie wywołują dużych uszkodzeń materiału genetycznego w komórce, przez co zmiana degradacji MDM2 jest niewielka. Niskie wartości wymuszenia ($R \in (1.0322, 1.9154)\, a.u.$), skutkują obniżeniem poziomu MDM2, ale nie są wystarczające, aby obniżyć poziom MDM2 do stopnia pozwalającego na bardzo wysoki poziom p53. W efekcie pojawia się punkt równowagi o pośrednich wartościach, pomiędzy punktami $\{020\}$ i $\{101\}$. Punkt stacjonarny w domenie $\{101\}$ istnieje w komórkach dla wymuszeń powyżej 1.9154 a.u. Jak zostanie wykazane w następnej sekcji, dla pewnych zakresów wymuszeń występują również punkty SSP, dlatego odpowiedź komórki będzie zależała od warunków początkowych. Niemniej jednak już dawka stresu większa od 1.9154 a.u. jest wystarczająca, aby w komórkach przy pewnych warunkach początkowych wywołać akumulację białka p53 i aktywację procesów apoptotycznych.

Należy również zwrócić uwagę, że dla pewnego zakresu wymuszeń w układzie nie występuje żaden punkt stacjonarny. Dla $R \in [0.8635, 1.0322]\, a.u.$ w układzie nie istnieje żaden punkt stacjonarny, zatem trajektorie nie będą stabilizowały się w żadnym punkcie, a będą oscylowały wokół osobliwego punktu równowagi w cyklu granicznym, co zostanie pokazane w następnej sekcji.

W każdej domenie poziomy białek p53 i PTEN w punktach stacjonarnych RSP są takie same dla danego zakresu wymuszeń, jak podane w Tabeli 5.3 dla konkretnych wymuszeń. Natomiast poziomy obydwóch form białka MDM2 zmieniają się zależnie od wartości R, ponieważ jego degradacja jest bezpośrednio zależna od wartości poziomu stresu.

5.4.2 Osobliwe punkty stacjonarne

W celu wyznaczenia lokalizacji i określenia stabilności punktów SSP w układzie wykorzystałam metodologię opisaną w podrozdziale 3.3.3. Model modułu regulatorowego można zapisać w postaci zawierającej wprost zmienne przełączające:

$$\frac{dP(t)}{dt} = p_1 - (d_{10} + d_{11}\, Z_{N1} + d_{12}\, Z_{N2})\, P(t), \tag{5.39}$$

$$\frac{dM(t)}{dt} = p_{20} + p_{21}\, Z_P - (k_{10} - k_{11}\, Z_T)\, M(t) - d_2\, (1 + R)\, M(t), \tag{5.40}$$

$$\frac{dN(t)}{dt} = (k_{10} - k_{11}\, Z_T)\, M(t) - d_2\, (1 + R)\, N(t), \tag{5.41}$$

$$\frac{dT(t)}{dt} = p_{30} + p_{31}\, Z_P - d_3\, T(t). \tag{5.42}$$

Dla uproszczenia zapisu jako wektor $\mathbf{F}$ oznaczyłam wektor pochodnych czasowych:

$$\mathbf{F} = \begin{bmatrix} dP(t)/dt \\ dM(t)/dt \\ dN(t)/dt \\ dT(t)/dt \end{bmatrix}, \tag{5.43}$$

a jako $\mathbf{x}$ wektor zmiennych stanu:

$$\mathbf{x} = \begin{bmatrix} P \\ M \\ N \\ T \end{bmatrix}. \tag{5.44}$$

Ze względu na istnienie dwóch wartości progowych dla zmiennej N są stworzone dwa wektory logoid (zmiennych przełączających), które w dalszej analizie będą oznaczane

$$\mathbf{Z_1} = \begin{bmatrix} Z_P \\ Z_M \\ Z_{N1} \\ Z_T \end{bmatrix} \tag{5.45}$$

oraz

$$\mathbf{Z_2} = \begin{bmatrix} Z_P \\ Z_M \\ Z_{N2} \\ Z_T \end{bmatrix}. \tag{5.46}$$

W analizowanym układzie nie występuje wartość progowa dla zmiennej M, jednak zmienna Z_M jest zawarta w wektorach $\mathbf{Z_1}$ i $\mathbf{Z_2}$ ze względu na konieczność zachowania odpowiedniego rozmiaru. Wektory logoid są wykorzystane do stworzenia dwóch macierzy logoid-Jacobiego ($\mathbf{L_1}$ i $\mathbf{L_2}$). Analiza Δ-regionów dla obydwu macierzy pozwala na określenie występowania punktów SSP. Najpierw przedstawię zastosowanie metody T. Mestla i in. [17] do wyznaczenia regionów, w których mogą znajdować się punkty SSP. Następnie, wykażę nieskuteczność tej metody w przypadku kilku Δ-regionów i przedstawię zaproponowaną, schematyczną metodę wyznaczania Δ-regionów w bardziej skomplikowanych układach.

Pierwsza macierz logoid-Jacobiego $\mathbf{L_1}$

W pierwszym kroku analizy stworzyłam macierz logoid-Jacobiego poprzez różniczkowanie pochodnych czasowych ($\mathbf{F}$) po kolejnych zmiennych przełączających ($\mathbf{Z_1}$). Macierz logoid-Jacobiego dla analizowanego układu ma postać:

$$\mathbf{L_1} = \frac{\partial \mathbf{F}}{\partial \mathbf{Z}_1} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & -d_{11}P & 0 \\ p_{21} & 0 & 0 & k_{11}M \\ 0 & 0 & 0 & -k_{11}M \\ p_{31} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}. \tag{5.47}$$

Kolejnym krokiem jest wyznaczenie podmacierzy logoid-Jacobiego dla wszystkich Δ-regionów. W układzie nie występuje wartość progowa dla zmiennej M, przez co w drugiej kolumnie znajdują się same zera. Z tego powodu można wykluczyć zmienną M z dalszej analizy i wykreślić z macierzy L_1 drugą kolumnę i wiersz. Pozwoli to na zredukowanie liczby analizowanych regionów. Zredukowana macierz logoid-Jacobiego ma następującą postać:

$$\mathbf{L_1} = \begin{bmatrix} 0 & -d_{11}P & 0 \\ 0 & 0 & -k_{11}M \\ p_{31} & 0 & 0 \end{bmatrix}. \tag{5.48}$$

Dla zredukowanej macierzy $\mathbf{L_1}$ można wyznaczyć 3 jednowymiarowe Δ-regiony, w których punkt SSP byłby położony na jednej wartości progowej. Patrząc na $\mathbf{L_1}$ widoczne jest, że

wartości na przekątnej logoid-jakobianu są równe 0, co informuje o braku punktu SSP. Jest to wniosek wynikający bezpośrednio z braku zależności zmiennej od swojej własnej wartości progowej i wiąże się z brakiem czarnych ścian w układzie. Podmacierze logoid-Jacobiego dla tych Δ-regionów można zapisać jako:

$$\mathbf{L_1}(\theta_P, M, N < \theta_{N2}, T) = [0], \tag{5.49}$$
$$\mathbf{L_1}(P, M, \theta_{N2}, T) = [0], \tag{5.50}$$
$$\mathbf{L_1}(P, M, N < \theta_{N2}, \theta_T) = [0]. \tag{5.51}$$

W układzie można wyznaczyć trzy dwuwymiarowe Δ-regiony, w których punkt SSP byłby położony na przecięciu dwóch granic:

- $\Delta(\theta_P, M, \theta_{N1}, T)$, dla którego podmacierz logoid-Jacobiego ma postać:

$$\mathbf{L_1}(\theta_P, M, \theta_{N1}, T) = \begin{bmatrix} 0 & -d_{11}\theta_P \\ 0 & 0 \end{bmatrix}, \tag{5.52}$$

  a wyznacznik jest równy 0, co oznacza, że w niniejszym regionie nie będzie występował punkt SSP:

$$det(\mathbf{L_1}(\theta_P, M, \theta_{N1}, T)) = 0. \tag{5.53}$$

- $\Delta(\theta_P, M, N < \theta_{N2}, \theta_T)$, gdzie podmacierz logoid-Jacobiego jest następująca:

$$\mathbf{L_1}(\theta_P, M, N < \theta_{N2}, \theta_T) = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ p_{31} & 0 \end{bmatrix}. \tag{5.54}$$

  Wyznacznik takiej macierzy jest zerowy, dlatego w tym regionie również nie znajduje się punkt SSP:

$$det(\mathbf{L_1}(\theta_P, M, N < \theta_{N2}, \theta_T)) = 0. \tag{5.55}$$

- $\Delta(P, M, \theta_{N2}, \theta_T)$, opisywany przez macierz logoid-Jacobiego równą:

$$\mathbf{L_1}(P, M, \theta_{N2}, \theta_T) = \begin{bmatrix} 0 & -k_{11}M \\ 0 & 0 \end{bmatrix}. \tag{5.56}$$

  Zerowa wartość wyznacznika świadczy o braku punktu SSP:

$$det(\mathbf{L_1}(P, M, \theta_{N2}, \theta_T)) = 0. \tag{5.57}$$

W układzie istnieje 3-wymiarowy Δ-region: $\Delta(\theta_P, M, \theta_{N1}, \theta_T))$, który jest zlokalizowany na przecięciu się wszystkich trzech granic. Podmacierz logoid-Jacobiego jest następująca:

$$\mathbf{L_1}(\theta_P, M, \theta_{N1}, \theta_T) = \begin{bmatrix} 0 & -d_{11}\theta_P & 0 \\ 0 & 0 & -k_{11}M \\ p_{31} & 0 & 0 \end{bmatrix} \tag{5.58}$$

a jej wyznacznik jest różny od zera:

$$det(\mathbf{L_1}(\theta_P, M, \theta_{N1}, \theta_T)) = p_{31}d_{11}\theta_P k_{11}M \neq 0, \tag{5.59}$$

zatem w tym regionie może znajdować się punkt SSP. Równania opisujące stan stacjonarny tego regionu są następujące:

$$\begin{aligned} 0 &= p_1 - (d_{10} + d_{11}\, Z_{N1})\theta_P, && (5.60)\\ 0 &= p_{20} + p_{21}\, Z_P - (k_{10} - k_{11}\, Z_T + d_2(1+R))M_s, && (5.61)\\ 0 &= (k_{10} - k_{11} Z_T)M_s - d_2(1+R)\,\theta_{N1}, && (5.62)\\ 0 &= p_{30} + p_{31} Z_P - d_3\,\theta_T. && (5.63) \end{aligned}$$

Na podstawie równań można wyznaczyć wartości logoid:

$$\begin{aligned} Z_{N1} &= \frac{p_1 - d_{10}\theta_P}{d_{11}\theta_P}, && (5.64)\\ Z_P &= \frac{d_3\theta_T - p_{30}}{p_{31}}, && (5.65)\\ Z_T &= \frac{k_{10}(p_{20} + p_{21}Z_P) - (k_{10} + d_2(1+R))(d_2(1+R)\theta_{N1})}{k_{11}(p_{20} + p_{21}Z_P) - k_{11}d_2(1+R)\theta_{N1}}. && (5.66) \end{aligned}$$

Wartości logoid dla zerowego wymuszenia w tym regionie są następujące: $Z_{N1} = 1.4848$, $Z_P = 0.6858$, $Z_T = 0.4839$. Ze względu na wartość Z_{N1} większą od 1, w Δ-regionie nie znajduje się punkt SSP. Co więcej niezależnie od wartości wymuszenia, wartość Z_{N1} zawsze będzie powyżej 1, więc dla żadnej wartości wymuszenia ten Δ-region nie będzie zawierał osobliwego punktu stacjonarnego.

Druga macierz logoid-Jacobiego $\mathbf{L_2}$

W drugim przypadku macierz logoid-Jacobiego stworzona po policzeniu pochodnych dla wektora logoid L_2 jest następująca:

$$\mathbf{L_2} = \frac{\partial \mathbf{F}}{\partial \mathbf{Z}_2} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & -d_{12}P & 0 \\ p_{21} & 0 & 0 & k_{11}M \\ 0 & 0 & 0 & -k_{11}M \\ p_{31} & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}. \qquad (5.67)$$

Macierz logoid-Jacobiego dla drugiego wektora zmiennych przełączających $\mathbf{Z_2}$ ma analogiczną strukturę do macierzy $\mathbf{L_1}$, różni się tylko wartością jednego parametru (d_{12} zamiast d_{11}). Z tego względu wyznaczniki podmacierzy będą zerowe w dokładnie tych samych Δ-regionach, dlatego też możemy pominąć krok wyznaczania podwyznaczników macierzy logoid-Jacobiego i przeanalizować właściwości tylko 3-wymiarowego Δ-regionu: $\Delta(\theta_P, M, \theta_{N2}, \theta_T)$. Podmacierz logoid-Jacobiego w tym regionie jest następująca:

$$\mathbf{L_2}(\theta_P, M, \theta_{N2}, \theta_T) = \begin{bmatrix} 0 & -d_{12}\theta_P & 0 \\ 0 & 0 & -k_{11}M \\ p_{31} & 0 & 0 \end{bmatrix}. \qquad (5.68)$$

a jej wyznacznik jest równy:

$$det(\mathbf{L_2}(\theta_P, M, \theta_{N2}, \theta_T)) = p_{31}d_{12}\theta_P k_{11} M \neq 0, \qquad (5.69)$$

zatem w tym regionie może znajdować się punkt SSP. Równania stanu stacjonarnego w tym regionie są analogiczne do równań (5.60)-(5.63) w analizowanym wcześniej 3-wymiarowym Δ-regionie:

$$\begin{aligned} 0 &= p_1 - (d_{10} + d_{11} + d_{12}\, Z_{N2})\theta_P, && (5.70)\\ 0 &= p_{20} + p_{21}\, Z_P - (k_{10} - k_{11}\, Z_T + d_2(1+R))M_s, && (5.71)\\ 0 &= (k_{10} - k_{11} Z_T)M_s - d_2(1+R)\,\theta_{N1}, && (5.72)\\ 0 &= p_{30} + p_{31} Z_P - d_3\,\theta_T. && (5.73) \end{aligned}$$

W analizowanym Δ-regionie poziom jądrowego białka MDM2 jest większy niż pierwsza wartość progowa θ_{N1}, zatem zmienna przełączająca Z_{N1} jest równa 1. Uwzględnione jest to w równaniu na poziom biała p53 (równanie (5.70)), gdzie podstawowe tempo degradacji jest równe sumie $d_{10} + d_{11}$. Na podstawie powyższych równań można wyznaczyć wartości zmiennych przełączających:

$$\begin{aligned} Z_{N2} &= \frac{p_1 - (d_{10} + d_{11})\theta_P}{d_{11}\theta_P}, && (5.74)\\ Z_P &= \frac{d_3\,\theta_T - p_{30}}{p_{31}}, && (5.75)\\ Z_T &= \frac{k_{10}(p_{20} + p_{21}\, Z_P) - (k_{10} + d_2(1+R))(d_2(1+R)\theta_{N1})}{k_{11}(p_{20} + p_{21} Z_P) - k_{11} d_2(1+R)\theta_{N1}}. && (5.76) \end{aligned}$$

W systemie bez wymuszenia ($R = 0\,a.u.$) wartości zmiennych przełączających są następujące: $Z_P = 0.6858$, $Z_{N2} = 0.3224$ oraz $Z_T = 0.4839$, zatem zawierają się w przedziale $[0, 1]$, co oznacza, że w tym Δ-regionie istnieje osobliwy punkt stacjonarny.

W powyższym Δ-regionie, w zależności od wymuszenia, zmienia się wartość zmiennej Z_T. Aby zapewnić wartość zmiennej $Z_T \in (0, 1)$, wartość stresu nie może przekroczyć pewnych wartości, które można wyznaczyć z nierówności:

$$0 \leqslant \frac{k_{10}(p_{20} + p_{21}\, Z_P) - (k_{10} + d_2(1+R))(d_2(1+R)\theta_{N1})}{k_{11}(p_{20} + p_{21} Z_P) - k_{11} d_2(1+R)\theta_{N1}} \leqslant 1. \qquad (5.77)$$

Zakres wymuszenia, dla jakiego w układzie występuje punkt SSP w analizowanym Δ-regionie, jest następujący $R \in (0, 12.578)$. Aby zbadać stabilność punktu SSP należy wyznaczyć wartości własne podmacierzy logoid-Jacobiego dla wybranego Δ-regionu.

$$det(\lambda \mathbb{1} - \mathbf{L_2}(\theta_P, M, \theta_{N2}, \theta_T)) = \begin{bmatrix} \lambda & d_{12}\theta_P & 0 \\ 0 & \lambda & k_{11}M \\ -p_{31} & 0 & \lambda \end{bmatrix}. \qquad (5.78)$$

Równanie charakterystyczne jest następujące:

$$\lambda^3 - d_{12}\theta_P p_{31} k_{11} M = 0, \qquad (5.79)$$

zatem co najmniej jedna wartość λ jest dodatnie:

$$\lambda_{1,2,3} = \sqrt[3]{d_{12}\theta_P p_{31} k_{11} M}. \qquad (5.80)$$

Dodatnie wartości własne oznaczają, że w układzie punkt SSP nie jest stabilny, zatem nie będzie występować stabilizacja trajektorii w punkcie, ani nie będą występować oscylacje wokół niego.

Powyższa metoda, zaproponowana przez T. Mestla i in. w publikacji [17], pozwala przeanalizować granice między domenami i określić występowanie punktów stacjonarnych w ich najbliższej okolicy. Na jej podstawie udało się wyznaczyć dwa Δ-regiony, w których zbadałam możliwość wystąpienia punktu SSP. Jednakże w układzie tym występuje transport białka MDM2 z cytoplazmy do jądra, przez co pomiędzy zmiennymi M i N istnieje bezpośrednia, dodatnia zależność, która nie jest uwzględniona w macierzy logoid-Jacobiego.

W związku z tym ograniczeniem metody T. Mestla i in. zaproponowałam swoją metodę analizy Δ-regionów opartą o macierz schematyczną, opisaną w podrozdziale 3.3.3. We wcześniejszej analizie przedstawiłam już macierze logoid-Jacobiego (równania (5.47) i (5.67)). Macierz Jacobiego jest następująca:

$$\mathbf{J} = \frac{\partial \mathbf{F}}{\partial \mathbf{x}} = \begin{bmatrix} -d_1^* & 0 & 0 & 0 \\ 0 & -d_2(1+R) - k_1^* & 0 & \\ 0 & k_1^* & -d_2(1+R) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -d_3 \end{bmatrix} \tag{5.81}$$

Schematyczna macierz logoid-Jacobiego jest taka sama dla macierzy $\mathbf{L_1}$ i $\mathbf{L_2}$, dlatego wystarczy stworzyć jedną łączoną macierz, która będzie miała następującą postać:

$$\mathbf{JL} = \begin{bmatrix} -j_{11} & 0 & -l_{13} & 0 \\ l_{21} & -j_{22} & 0 & l_{24} \\ 0 & j_{32} & -j_{33} & -l_{34} \\ l_{41} & 0 & 0 & -j_{44} \end{bmatrix}. \tag{5.82}$$

W macierzy można wyróżnić dwie zamknięte sekwencje:

Sekwencja 1: $P \to M \to N \to P$, w której zależność między N i P jest ujemna ($-l_{13}$), co świadczy o możliwości wystąpienia oscylacji na przecięciu wartości progowych θ_P i θ_{N1} oraz θ_P i θ_{N2}. Regiony ten nie zostały wyznaczone do dalszej analizy przy zastosowaniu standardowego podejścia [17].

Sekwencja 2: $P \to T \to M \to N \to P$, w której również jest oddziaływanie ujemne ($-l_{13}$), co sugeruje możliwość wystąpienia oscylacji na przecięciu 3 wartości progowych θ_P, θ_T θ_{N1} oraz θ_P, θ_T θ_{N2}. Region te zostały wyznaczone również przy zastosowaniu metody T. Mestla i in. i zostały przeanalizowane wcześniej.
Wykonałam analizę wartości zmiennych przełączających oraz zmiennych stanu w wyznaczonych powyżej Δ-regionach i wyznaczyłam lokalizację dwóch kolejnych punktów SSP w następujących Δ-regionach:

- $\Delta(\theta_P, M, \theta_{N2}, T < \theta_T)$ Równania opisujące stan stacjonarny w tym regionie są następujące:

$$\begin{aligned} 0 &= p_1 - (d_{10} + d_{11} + d_{12} Z_{N2})\theta_T, && (5.83) \\ 0 &= p_{20} + p_{21} Z_P - k_{10} M_s - d_2(1+R) M_s, && (5.84) \\ 0 &= k_{10} M_s - d_2(1+R)\theta_{N2}, && (5.85) \\ 0 &= p_{30} + p_{31} Z_P - d_3 T_s. && (5.86) \end{aligned}$$

Wartość zmiennej przełączającej Z_{N2} jest następująca:

$$Z_{N2} = \frac{p_1 - (d_{10} + d_{11})\theta_P}{d_{11}\theta_P} = 0.3224. \tag{5.87}$$

Rozwiązując układ równań (5.84) i (5.85) wyznaczyłam wartość zmiennej Z_P, która jest zależna od R:

$$\begin{aligned} Z_P &= R^2 \frac{d_2^2\theta_{N_2}}{k_{10}p_{21}} + R\frac{2d_2^2\theta_{N2}/k_{10} + d_2\theta_{N2}}{p_{21}} \\ &+ \frac{d_2^2\theta_{N2}/k_{10} + d_2\theta_{N2} - p_{20}}{p_{21}}. \end{aligned} \tag{5.88}$$

Na podstawie powyższego równania wyliczyłam zakres wymuszenia, dla którego $Z_P \in (0,1)$. Zakres ten wynosi $R \in (0.8635, 9.9091)\, a.u.$ Jednocześnie w analizowanym Δ-regionie zmienna T musi być mniejsza od wartości progowej θ_T. Wartość T_s jest zależna od zmiennej przełączającej Z_P, co wynika z równania (5.86). Maksymalna dozwolona wartość zmiennej Z_P pozwalająca na spełnienie tego warunku jest równa 0.6858, przez co maksymalna wartość wymuszenia R jest równa $7.7038\, a.u.$ Podsumowując w Δ-regionie $(\theta_P, M, \theta_{N2}, T < \theta_T))$ znajduje się osobliwy punkt stacjonarny dla wymuszeń z zakresu $[0.8635, 7.7038]\, a.u.$

Ze względu na występowanie transportu w analizowanym układzie, nie ma możliwości sprawdzenia stabilności punktu SSP poprzez wyliczenie wartości własnych macierzy logoid-Jacobiego. Podobnie jak w przypadku modeli analizowanych w Rozdziale 4, macierz logoid-Jacobiego nie zawiera niektórych zależności pomiędzy zmiennymi, zatem na jej podstawie nie można wnioskować o zachowaniu układu. Charakter układu w okolicy punktu określiłam na podstawie symulacji numerycznych, które wykazały występowanie stabilnych oscylacji.

- $\Delta(\theta_P, M, \theta_{N2}, T > \theta_T)$ Równania opisujące stan stacjonarny w tym regionie są następujące:

$$0 = p_1 - (d_{10} + d_{11} + d_{12}Z_{N2})\theta_T, \tag{5.89}$$
$$0 = p_{20} + p_{21}Z_P - (k_{10} - k_{11})M_s - d_2(1+R)M_s, \tag{5.90}$$
$$0 = (k_{10} - k_{11})M_s - d_2(1+R)\theta_{N2}, \tag{5.91}$$
$$0 = p_{30} + p_{31}Z_P - d_3T_s. \tag{5.92}$$

Wartość zmiennej przełączającej Z_{N2} ma taką samą wartość, jak w poprzednim przypadku, czyli 0.3224. Analogicznie jak w poprzednim przypadku rozwiązałam układ równań (5.90) - (5.91) i wyznaczyłam formułę opisującą wartość zmiennej Z_P w zależności od wymuszenia R:

$$\begin{aligned} Z_P &= R^2\frac{d_2^2\theta_{N2}}{(k_{10} - k_{11})p_{21}} + R\frac{2d_2^2\theta_{N2}/(k_{10} - k_{11}) + d_2\theta_{N2}}{p_{21}} \\ &+ \frac{(d_2^2\theta_{N2}/(k_{10} - k_{11}) + d_2\theta_{N2} - p_{20}}{p_{21}}. \end{aligned} \tag{5.93}$$

Na podstawie powyższego wzoru można wyznaczyć zakres wymuszenia $R \in (0, 1.0322)\, a.u.$ dla którego $Z_P \in (0,1)$. Ze względu na konieczność zapewnienia

wartości T_s powyżej wartości progowej θ_T, wartość Z_P musi być większa od 0.6858, zatem minimalna wartość wymuszania wynosi 0.7059 a.u. W tym Δ-regionie znajduje się punkt stacjonarny dla $R \in [0.7059, 1.0322)\, a.u.$ W tym regionie macierz logoid-Jacobian również nie zawiera pełnych informacji o strukturze układu, zatem nie ma możliwości zbadania stabilności punktu SSP. Podobnie też numerycznie zbadałam występowanie wokół niego niegasnących oscylacji.

W wyniku powyższej analizy wyznaczone zostały 3 osobliwe punkty stacjonarne, które występują w układzie dla różnych zakresów wymuszenia:

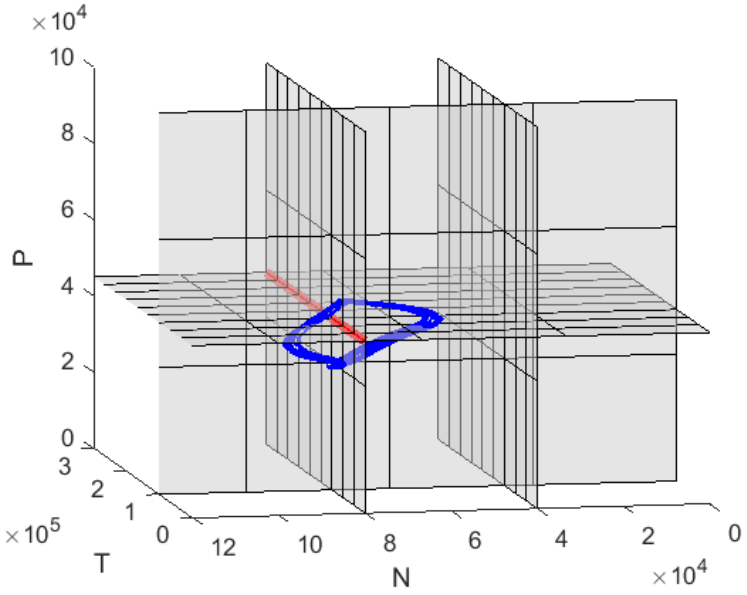
- w Δ-regionie $(\theta_P, M, \theta_{N2}, \theta_T)$ dla $R \in [0; 12.578)\, a.u.$ – punkt niestabilny,
- w Δ-regionie $(\theta_P, M, \theta_{N2}, T < \theta_T)$ dla $R \in (0.8635; 7.7038)\, a.u.$ – brak możliwości analitycznego określenia stabilności,
- w Δ-regionie $(\theta_P, M, \theta_{N2}, T > \theta_T)$ dla $R \in [0.7059; 1.0322)\, a.u.$ – brak możliwości analitycznego określenia stabilności.

Punkty SSP znajdują się na przecięciu wartości progowej θ_P oraz θ_{N2}. Na wykresie (Rysunek 5.7) jest przedstawiona lokalizacja punktów SSP w przestrzeni stanu. Punkty SSP (czerwone kropki) tworzą oś na przecięciu wartości progowych θ_P i θ_{N2} dla wartości $T < \theta_T$, $T = \theta_T$ i $T > \theta_T$. Przy czym punkt dla $T = \theta_T$ jest niestabilny. Występowanie osobliwych punktów stacjonarnych będących na granicy stabilności objawia się poprzez oscylacyjny charakter przebiegów czasowych. W celu zobrazowania takiego zachowania w układzie, na wykresie przedstawiłam przykładową trajektorię przy wymuszeniu $R = 6\, a.u.$, która krąży wokół punktu SSP w Δ-regionie dla $T < \theta_T$ (kolor niebieski). Oscylacje w układzie są wynikiem istnienia pętli sprzężenia ujemnego pomiędzy białkami p53 oraz MDM2 i znajdują potwierdzenie w wynikach eksperymentalnych badań mikroskopowych [74].

5.4.3 Analiza bifurkacyjna

Powyższa analiza modułu regulatorowego białka p53 wykazała, że charakter odpowiedzi układu oraz lokalizacja punktów stacjonarnych zmienia się, w zależności od wartości wymuszenia R. W układzie występują zarówno zwyczajne punkty stacjonarne, w których układ osiąga stan stacjonarny oraz osobliwe punkty stacjonarne, wokół których mogą występować niegasnące oscylacje. Fakt jednoczesnego występowania jednocześnie dla danej wartości stresu różnych punktów stacjonarnych sugeruje, że odpowiedź układu zależy od warunków początkowych, a różne punkty stacjonarne będą miały różne baseny przyciągania.

W celu zbadania zmiany odpowiedzi układu wraz ze wzrostem poziomu stresu R, wykonałam wykresy bifurkacyjne obrazujące poziom białka P, N oraz T w zależności od wartości R (Rysunek 5.8). Na wykresy naniosłam wyliczone wartości poziomów białek w punktach RSP (czarna linia). Aby zobrazować zakres zmienności poziomów białek wokół punktów SSP, wyznaczałam analitycznie dokładną lokalizację punktu SSP dla różnych wartości R, wybranych z pewnym krokiem próbkowania i wykonywałam deterministyczną symulację (200 godzin). Następnie badałam poziom białek w czasie ostatnich 50 godzin symulacji, jeśli występowały oscylacje to nanosiłam ich wartość minimalną i maksymalną na wykres. Wokół niestabilnego punktu SSP (na przecięciu trzech wartości progowych) nie występowały oscylacje. Natomiast zakresy oscylacji wokół punktów SSP w Δ-regionie, poniżej i

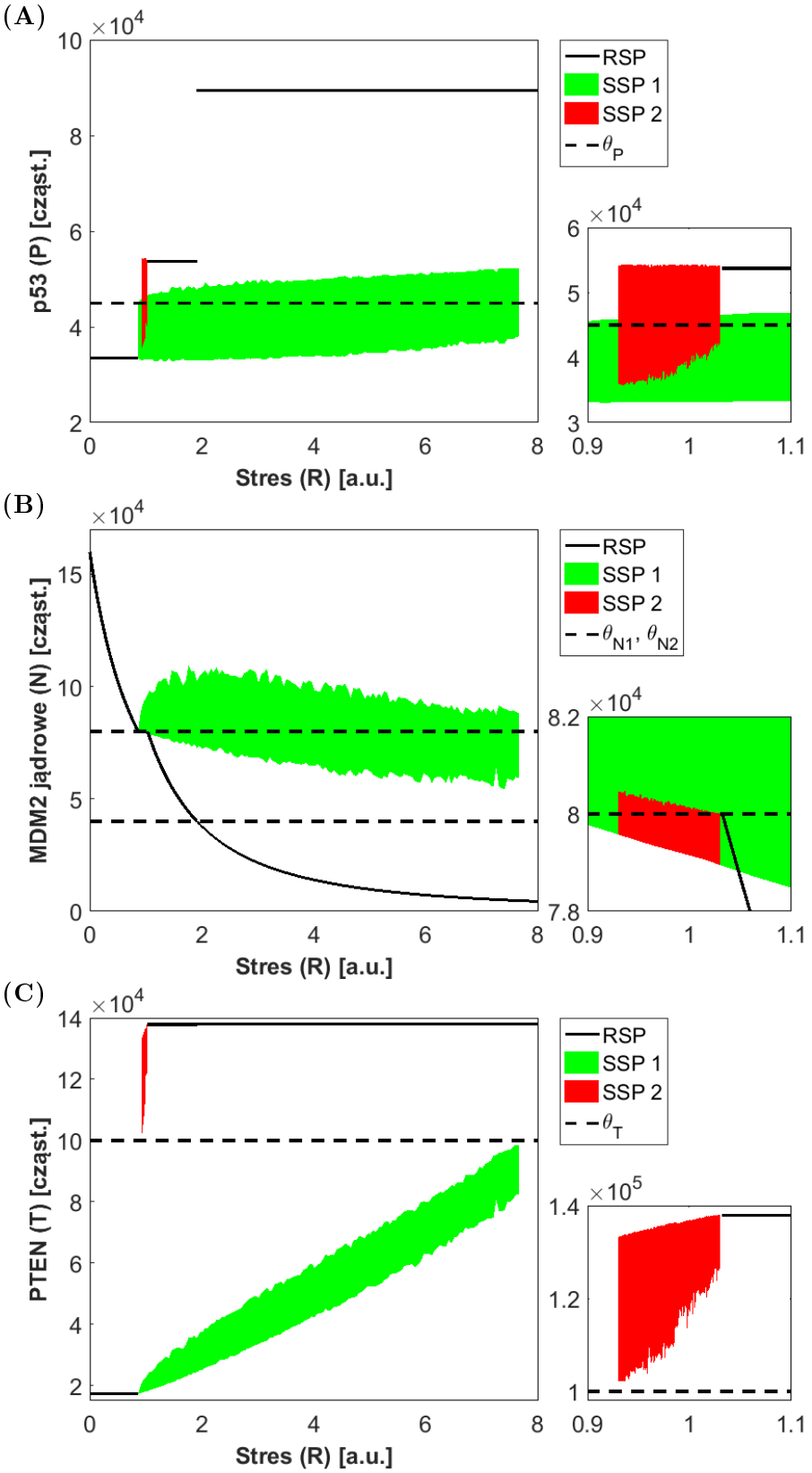


Rysunek 5.7: Lokalizacja punktów SSP w przestrzeni stanu wyznaczonych dla modelu białka p53 dla różnych wartości wymuszenia (czerwony - punkty SSP, niebieski - przykładowa trajektoria układu dla $R = 6\,a.u.$)

powyżej wartości progowej θ_T, naniosłam na wykres jako chmurę o kolorach, odpowiednio czerwonym i zielonym. Zbadany numerycznie zakres oscylacji jest pokazany na wykresach bifurkacyjnych zależności poziomu białka od wymuszenia R: dla białka p53 — Rysunek 5.8A, dla białka MDM2 jądrowego — Rysunek 5.8B i dla białka PTEN — Rysunek 5.8C.

Punkt SSP lokalizowany w Δ-regionie $(\theta_P, M, \theta_{N2}, T < \theta_T)$ (oznaczony jako SSP 1) istnieje dla wymuszenia $R \in (0.8635; 7.7038)\,a.u.$ W wynikach symulacji minimalne i maksymalne wartości poziomów białka tworzą chmurę punktów w otoczeniu wartości progowej — poziom białka P oscyluje wokół wartości progowej θ_P (Rysunek 5.8A), poziom białka N oscyluje wokół wartości progowej θ_{N2} (Rysunek 5.8B), a poziom białka T jest poniżej wartości progowej θ_T (Rysunek 5.8C).

Wokół punktu stacjonarnego lokalizowanego w Δ-regionie $(\theta_P, M, \theta_{N2}, T > \theta_T)$ (oznaczony jako SSP 2) również występują oscylacje. W symulacjach numerycznych oscylacje występują dla mniejszego od wyznaczonego analitycznie zakresu wymuszeń, czyli $R \in (0.95; 1.0322)\,a.u.$ Wynika to z przejścia trajektorii cyklu wokół punktu przez wartość progową θ_T. Na wykresie bifurkacyjnym poziomu białka T (patrz Rysunek 5.8C) widoczne jest, że dla wartości R poniżej 0.95 a.u, poziom T spada poniżej wartości progowej, co skutkuje wejściem trajektorii do basenu przyciągania punktu SSP 1. W rezultacie dla tych wartości R występują oscylacje tylko wokół punktu SSP w Δ-regionie $(\theta_P, M, \theta_{N2}, T < \theta_T)$. Zakres wartości R, dla których obserwuje się oscylacje, jest przedstawiony na Rysunku 5.8 na czerwono. W celu zwiększenia czytelności wykresów, po prawej stronie przedstawiłam powiększenie regionu, w którym występują punkty SSP 2. Niestety, analityczne podejście do wyznaczania punktów SSP nie uwzględnia lokalizacji wartości progowych, mogących wystąpić na drodze trajektorii oscylujących wokół punktu SSP, co powoduje przejście do innej domeny, dlatego nawet w przypadku występowania punktu SSP, w układzie mogą nie występować oscylacje.



Rysunek 5.8: Wykresy bifurkacyjne poziomów białek w zależności od wymuszenia; (A) Wykres bifurkacyjny białka p53 (P); (B) Wykres bifurkacyjny białka jądrowego MDM2 (N); (C) Wykres bifurkacyjny białka PTEN (T) (po prawej stronie wykresów — powiększenie dla $R = (0.9, 1.1)\, a.u.$)

W celu zobrazowania przebiegów czasowych możliwych odpowiedzi układu, przy różnych poziomach stresu, wykonałam symulacje numeryczne przy różnych warunkach początkowych. Na Rysunku 5.9 przedstawiłam przebiegi czasowe dla białka p53 (pierwsza kolumna), MDM2 jądrowego (druga kolumna) i PTEN (trzecia kolumna) przy losowych warunkach początkowych. Na każdym wykresie wyrysowane jest 100 przebiegów.

Jako pierwszą badaną dawkę wybrałam $R = 0.88\,a.u.$, ponieważ według obliczeń analitycznych, przy tej dawce powinny występować dwa punkty SSP, co powinno powodować dwa różne zakresy oscylacji. W symulacjach numerycznych przy $R = 0.88\,a.u.$ w układzie występują wyłącznie oscylacje wokół punktu SSP w Δ-regionie $(\theta_P, M, \theta_{N2}, T < \theta_T)$. Nawet jeśli początkowy poziom PTEN jest wysoki, po pewnym czasie zaczyna się on obniżać i spada poniżej wartości progowej θ_T, a układ zaczyna oscylować przy niskich poziomach PTEN oraz p53 (Rysunek 5.9A).

Natomiast przy wymuszeniu równym 1 a.u., zarówno obliczenia analityczne, jak i wykresy bifurkacyjne, sugerują występowanie dwóch punktów SSP. W przebiegach czasowych, w zależności od warunków początkowych, w układzie widoczne są dwa różne zakresy oscylacji. Pierwszy zakres oscylacji występuje przy wysokim poziomie białka PTEN i wynika z obecności punktu osobliwego w Δ-regionie $(\theta_P, M, \theta_{N2}, T > \theta_T)$ (punkt SSP 2, oznaczony na czerwono na wykresie – Rysunek 5.9B). Drugi zakres oscylacji występuje przy niskim poziomie PTEN w Δ-regionie $(\theta_P, M, \theta_{N2}, T < \theta_T)$ (punkt SSP 2, przebiegi zielone– Rysunek 5.9B).

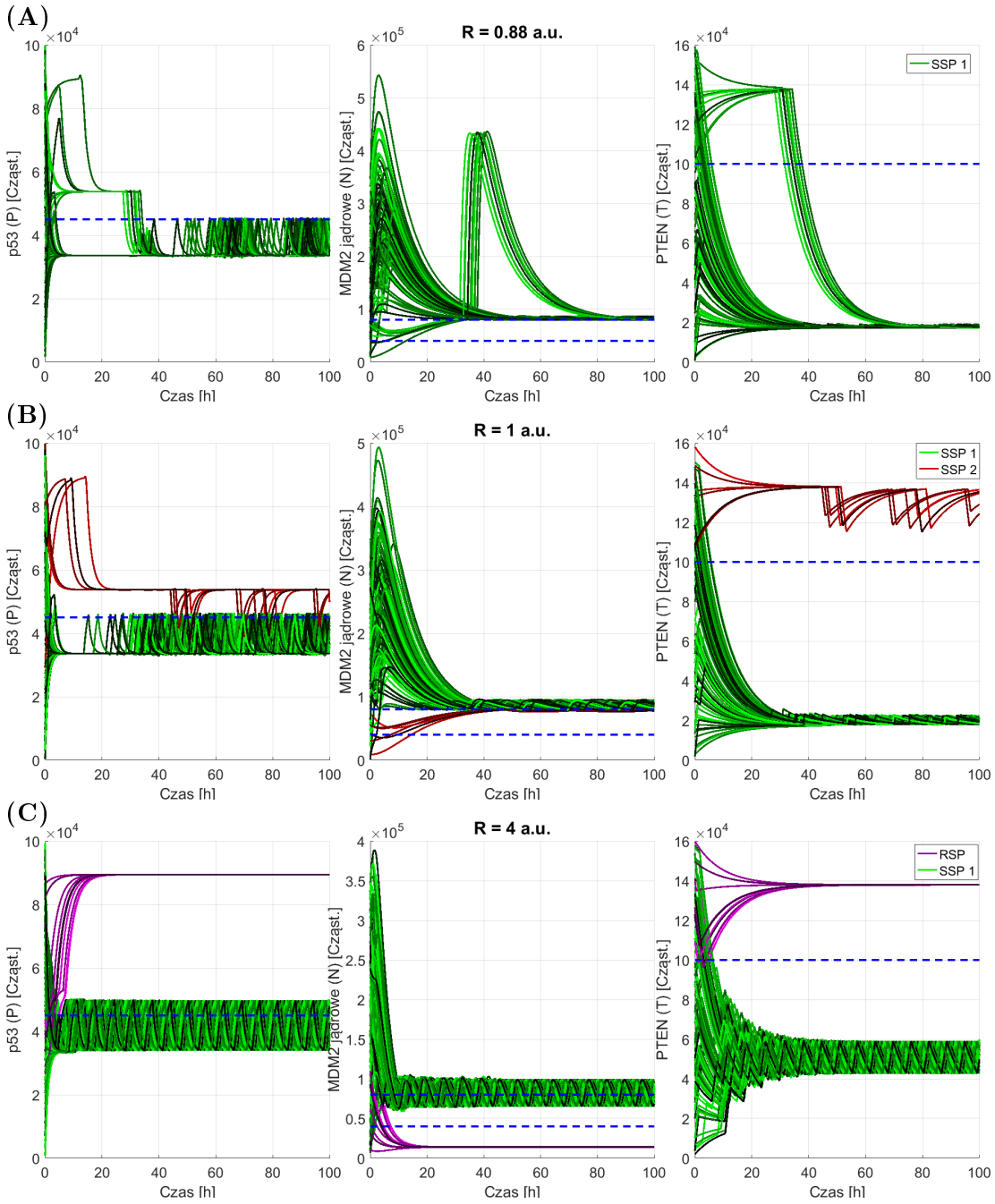
Dla większych wartości wymuszenia (np. $R = 4\,a.u.$), w układzie istnieje zwyczajny punkt równowagi w domenie $\{101\}$ oraz osobliwy punkt równowagi w Δ-regionie $(\theta_P, M, \theta_{N2}, T < \theta_T)$. Część trajektorii stabilizuje się w punkcie RSP, który charakteryzuje się wysokimi poziomami p53 oraz PTEN oraz niskim poziomem MDM2 (punkt RSP, przebiegi oznaczone na fioletowo – Rysunek 5.9C).

5.5 Heterogeniczność populacji komórkowej

Zróżnicowanie odpowiedzi populacji komórkowej na czynniki zewnętrzne jest obserwowane zarówno w żywych organizmach, jak i w hodowlach komórkowych prowadzonych *in vitro*. Zróżnicowanie wynika z osobniczych właściwości komórki, takich jak warunki fizykochemiczne oraz stężenie substancji pomocniczych lub inhibitorów danej reakcji, jak również z losowości procesów. W niniejszym podrozdziale przeanalizowałam wpływ zróżnicowania populacji, pod względem zdolności do aktywacji procesów w module regulatorowym białka p53, na typ aktywowanej odpowiedzi. W tym celu wykonałam serie symulacji populacji heterogenicznej o różnych właściwościach oraz przy różnych wymuszeniach, zgodnie z algorytmem opisanym w podrozdziale 3.4. Jako wymuszenie wybrałam dawki, które wywołują różne typy odpowiedzi w układzie natywnym: 0.5 a.u., 1 a.u., 5 a.u. oraz 9 a.u. Lokalizację wartości progowych w populacji komórkowej określiłam za pomocą losowania z rozkładu normalnego o średniej równej danej wartości progowej i odchyleniach standardowych równych odpowiednio 5%, 10%, 15% i 20% wartości progowej.

Stworzony model pozwala modelować trzy podstawowe typy odpowiedzi komórek na zadany stres:

- komórki normalne – brak odpowiedzi na stres; niski poziom p53 w komórce;
- komórki zatrzymane – aktywowana blokada cyklu komórkowego; podwyższony poziom p53, najczęściej w połączeniu z oscylacjami;



Rysunek 5.9: Przebiegi czasowe poziomów białek p53, MDM2 jądrowego oraz PTEN dla różnych wymuszeń i różnych puntów startowych; (A) $R = 0.88\,a.u.$; (B) $R = 1\,a.u.$ (C) $R = 4\,a.u.$)

- komórki apoptotyczne – aktywowana śmierć komórkowa; stały, wysoki poziom p53 .

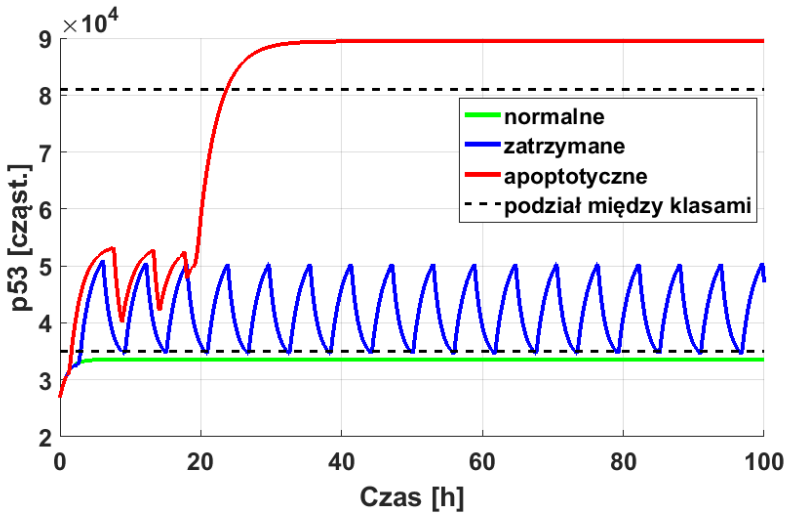
Początkowe poziomy białek odpowiadają komórce w stanie normalnym i są takie same jak w Tabeli 5.1. W celu klasyfikacji komórki do jednego z powyższych typów, wprowadziłam dwa progi odcięcia dla poziomu białka p53. Lokalizację tych progów ustaliłam na podstawie analizy modelu oraz analizy bifurkacyjnej. Taki podział populacji jest zgodny z eksperymentami biologicznymi, w których obserwuje się dwa progi aktywacji odpowiedzi na stres — przekroczenie niskiego progu białka p53 obserwuje się w komórkach aktywujących blokadę cyklu komórkowego, natomiast przekroczenie drugiego progu poziomu białka p53 powoduje aktywację apoptozy [86].

W początkowej fazie po napromienieniu, zarówno w komórce zatrzymanej, jak i apoptotycznej występują oscylacje, dlatego dla jednoznacznego określenia losu komórki, badałam poziom białka p53 w ostatnich 10 godzinach symulacji (Rysunek 5.10). Pierwszy próg odcięcia ustaliłam na wartości $3.4 \cdot 10^4$ cząsteczek. Jeśli w końcowych 10 godzinach symulacji maksymalny poziom białka p53 nie przekroczył tej wartości, to komórka była klasyfikowana do subpopulacji komórek normalnych. Odpowiedź taka jest obserwowana w komórce o nominalnych wartościach progowych przy wymuszeniu $R = 0.5\, a.u.$ (Rysunek 5.10 - zielona linia). Drugi próg odcięcia ustaliłam na wartości $8.1 \cdot 10^4$ cząsteczek. Komórki są zaklasyfikowane jako zatrzymane, jeśli minimalny poziom białka p53 w ostatnich 10 godzinach symulacji jest niższy od drugiej wartości odcięcia, a jednocześnie maksymalny poziom jest wyższy od pierwszego progu odcięcia. Komórka poddana stresowi o dawce $R = 5\, a.u.$ posiada oscylacje poziomu p53, które spełniają ten warunek, co jest widoczne na Rysunku 5.10 (niebieska linia). Do subpopulacji komórek apoptotycznych należą te, w których minimalny poziom białka p53 w ostatnich 10 godzinach symulacji jest wyższy niż druga wartość odcięcia. Na Rysunku 5.10, pokazałam również przykładową odpowiedź apoptotyczną komórki po zadziałaniu wysokiej dawki stresu – $R = 9\, a.u.$ (czerwona linia), w której utrzymuje się wysoki poziom białka p53.

W kolejnych podrozdziałach przedstawiłam wpływ lokalizacji wartości progowych, przy których występuje przełączenie, w analizowanym układzie, na rodzaj aktywowanej odpowiedzi.

5.5.1 Wpływ położenia progu θ_P na odpowiedź komórki

W eksperymentach biologicznych prowadzonych na jednolitej populacji komórkowej obserwuje się zróżnicowanie odpowiedzi. W komórkach pochodzących z tej samej linii źródłem heterogeniczności jest między innymi zróżnicowanie w aktywacji genów, które następnie wpływa na produkcję białka. Zróżnicowanie ekspresji genów może wynikać z różnic w stężeniach substancji zaangażowanych w produkcję białka, takich jak czynniki transkrypcyjne, enzymy wchodzące w skład maszynerii transkrypcyjnej, rybosomy czy miRNA. W przypadku modułu regulatorowego białka p53, badania eksperymentalne wykazały powiązanie między aktywnością transkrypcyjną białka p53 a rodziną białek p300-CBP (*CREB-binding protein*). Przyłączenie p300/CREB do białka p53 skutkuje stworzeniem stabilnego kompleksu łączącego się z DNA. W komórce mogą również występować inhibitory, takie jak wirusowe białko E1A. Połączenie białka p300/CREB z białkiem adenowirusa E1A skutkuje ograniczeniem zdolności białka p53 do aktywacji genów takich jak p21 i bax. Białko p53 i E1A konkurują między sobą o tworzenie kompleksów z p300/CREB, zatem wraz ze wzrostem stężenia p53 będzie wzrastało prawdopodobieństwo stworzenia kompleksu



Rysunek 5.10: Przebiegi czasowe poziomu białka p53 przy nominalnym ułożeniu wartości progowych w odpowiedzi w zależności od różny dawek stresu

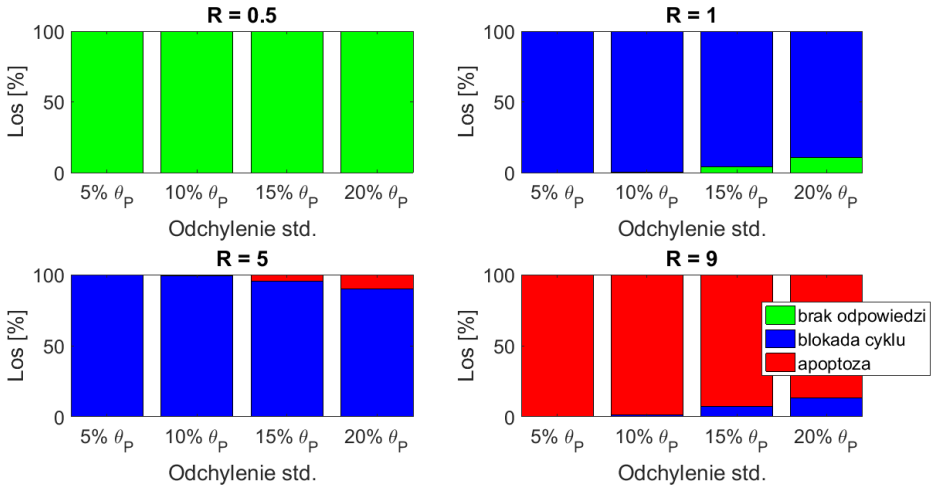
p300/CREB – p53 i w efekcie aktywacji genów [87]. Na tym przykładzie widać, że aktywacja genów i wzrost tempa produkcji białek zależnych od p53 może zachodzić przy różnych poziomach tego białka, zależnych od wewnętrznych właściwości danej komórki.

W stworzonym modelu modułu regulatorowego białka p53, zjawisko to można badać poprzez zróżnicowanie lokalizacji wartości progowej θ_P, przy której następuje aktywacja procesu produkcji MDM2 oraz PTEN. Wykonano serie symulacji numerycznych, w których analizowano zachowanie populacji komórkowej złożonej z 10 000 komórek o losowym ułożeniu wartości progowych θ_P. W każdej komórce wartość progowa θ_P jest określona poprzez losowanie z rozkładu normalnego. Średnia rozkładu normalnego jest równa wartości nominalnej θ_P (czyli 45 000 cząst.), a odchylenie standardowe jest równe 5%, 10%, 15% lub 20% nominalnej wartości progowej. Po ustaleniu wartości progowej w danej komórce, wykonane są symulacje deterministyczne, a wartość progowa nie zmienia się w czasie symulacji.

W przypadku niskiego poziomu stresu ($R = 0.5\,a.u.$), niezależnie od zróżnicowania populacji, poziom białka we wszystkich komórkach jest niski, przez co nie została aktywowana odpowiedź na stres (Rysunek 5.11, lewy górny wykres). Ze względu na homogeniczność odpowiedzi, dawka ta nie będzie dalej analizowana, a zamiast niej wykonana zostanie analiza nieznacznie większej dawki ($R = 1\,a.u.$), która w deterministycznym modelu wywołuje blokadę cyklu komórkowego.

W populacji o małym odchyleniu standardowym (5% θ_P) populacja jest homogeniczna niezależnie od dawki stresu, a wszystkie komórki aktywują taką samą odpowiedź, zgodną z odpowiedzią przy nominalnych wartościach progów (Rysunek 5.10). Dla większych wartości odchyleń standardowych w populacji pojawia się subpopulacja komórek, które aktywują inny typ odpowiedzi.

W komórkach potraktowanych stresem o dawce 1 a.u. dominująca odpowiedź to blokada cyklu komórkowego. Jednakże przy dużym odchyleniu standardowym (20% θ_P) pojawia się około 10-procentowa subpopulacja komórek, które nie aktywują odpowiedzi na stres (Rysunek 5.11 prawy górny wykres). Dla dawki $R = 5\,a.u.$ dominującą odpowiedzią przy więk-



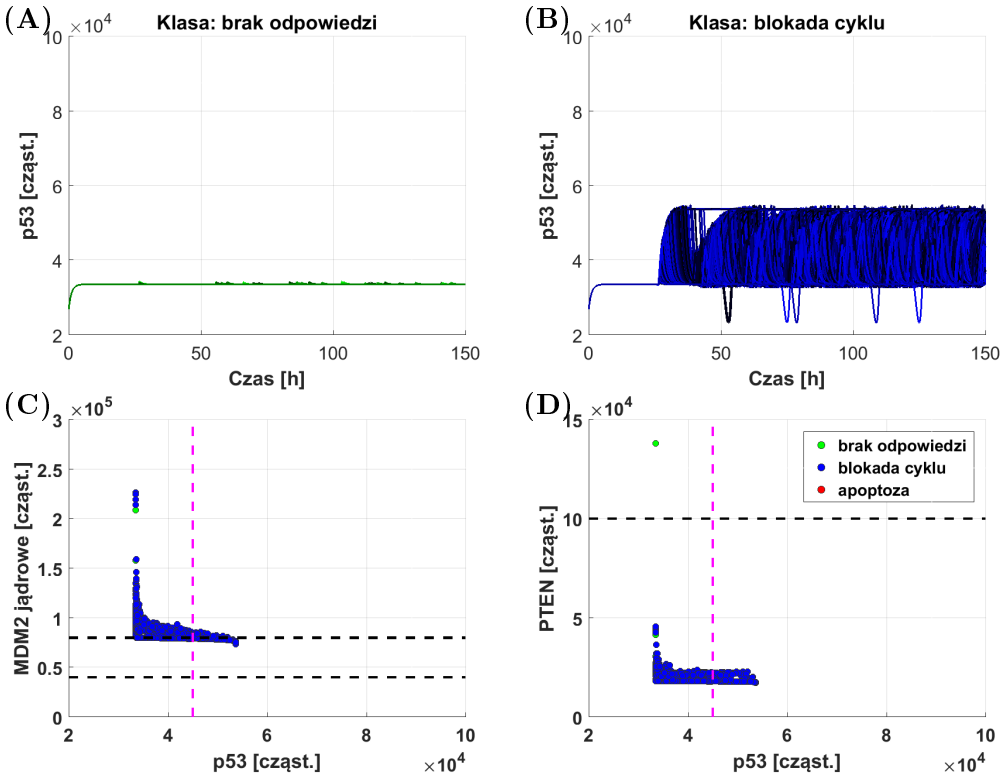
Rysunek 5.11: Zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej w populacji heterogenicznej pod względem lokalizacji θ_P na różne dawki wymuszenia

szych wartościach odchylenia standardowego jest blokada cyklu komórkowego, ale pojawia się również frakcja komórek o wysokim, stałym poziomie p53, odpowiadającym za aktywację procesu apoptozy. Frakcja apoptotyczna zwiększa się wraz ze wzrostem odchylenia standardowego (Rysunek 5.11 lewy dolny wykres). Dla dawki $R = 9\,a.u.$ dominującą odpowiedzią populacji jest apoptoza, a wzrost zróżnicowania lokalizacji progu powoduje wzrost frakcji komórek przeżywających, o zablokowanym cyklu komórkowym (Rysunek 5.11 prawy dolny wykres). W celu lepszego poznania zachowania populacji po zadziałaniu różnymi dawkami stresu, poddałam dokładniejszej analizie populacje o największym zróżnicowaniu wartości progowych, skutkującym największym zróżnicowaniem odpowiedzi.

Pod wpływem niskiej dawki stresu zewnętrznego ($R = 1\,a.u.$, odchylenie std. 20% θ_P) w niewielkiej subpopulacji komórkowej następuje tylko nieznaczne podniesienie poziomu p53, przez co nie jest aktywowana odpowiedź (Rysunek 5.12A). W pozostałej części komórek po około 30 godzinach jest aktywowana odpowiedź: poziom białka p53 wzrasta, a następnie zaczyna oscylować (Rysunek 5.12B). W komórkach tych występują oscylacje poziomu p53 oraz MDM2 wokół wartości granicznych θ_P oraz θ_{N2}, co jest widoczne jako chmura punktów na wykresie końcowych poziomów białka (Rysunek 5.12C). Na wykresach przestrzeni stanu (Rysunek 5.12C i D) przerywaną linią oznaczyłam wartości progowe poszczególnych zmiennych. Wartość progowa θ_P jest oznaczona na różowo, ponieważ jest to średnia wartość progowa w populacji komórek, podczas gdy każda komórka ma różną lokalizację tego progu. Komórki, które nie aktywowały odpowiedzi na stres, mają nieprawidłowo funkcjonujący moduł regulatorowy. 99% komórek w tej subpopulacji posiada wysoki poziom białka PTEN jednak ze względu na identyczne poziomy białek na wykresie (Rysunek 5.12D), widoczna jest jedynie jedna zielona kropka (faktycznie jest tam 1 037 komórek). Wysoki poziom białka PTEN wynika ze zbyt niskiego progu dla aktywacji genu, przez co możliwe jest nagromadzenie tego białka. Wysoki poziom PTEN ogranicza transport MDM2 do jądra, przez co pętla sprzężenia ujemnego nie działa poprawnie. Poziom p53 jest niski i nie występują jego oscylacje. Pozostałe komórki należące do subpopulacji normalnej, posiadają standardowo niski poziom PTEN, ale oscylacje poziomu białka p53 są na tak niskim

poziomie, że nie przekraczają pierwszego punktu odcięcia.

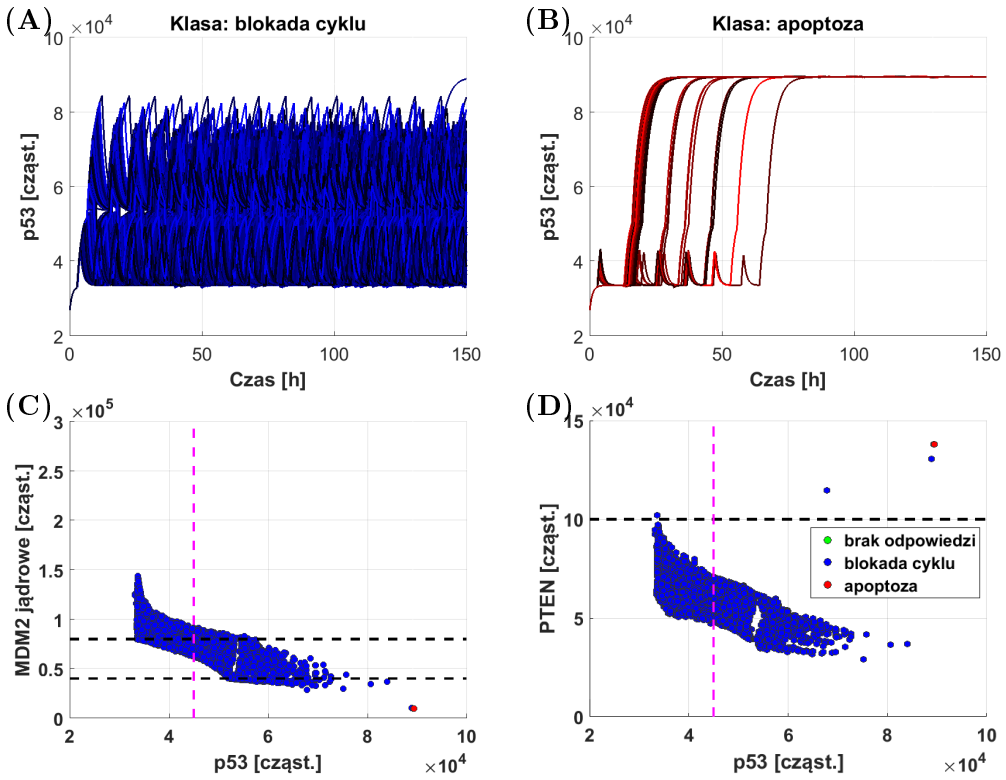
Średnia dawka stresu zewnętrznego ($R = 5\,a.u.$) wywołuje we wszystkich analizowanych komórkach odpowiedź — w zdecydowanej większości jest to blokada cyklu komórkowego, a w około 10% komórek z populacji o dużym zróżnicowaniu θ_P jest aktywowana śmierć komórki (Rysunek 5.11C). W subpopulacji aktywującej blokadę cyklu komórkowego można zaobserwować różne zakresy oscylacji (Rysunek 5.13A). We wczesnej odpowiedzi komórek apoptotycznych również występują oscylacje, jednak są one przy stosunkowo niskim poziomie p53, a po kilkudziesięciu godzinach poziom p53 gwałtownie wzrasta (Rysunek 5.13B) Wartość progowa p53 (θ_P) wpływa również na tempo aktywowania odpowiedzi, przez co następuje desynchronizacja oscylacji. Dodatkowo komórki różnią się czasem podjęcia decyzji apoptotycznej. W przestrzeni 2D (p53 vs MDM2 jądrowe) chmura punktów stworzona przez klasę komórek zatrzymanych jest rozciągnięta, co wynika z występujących różnych typów oscylacji (Rysunek 5.13C). Należy mieć na uwadze, że wartość progowa θ_P oznaczona różową linią jest średnią wartością w populacji, a w poszczególnych komórkach wartość ta może być znacząco przesunięta, co skutkuje dużym zróżnicowaniem poziomów białka w populacji zatrzymanej. Widoczny jest również podział populacji na dwa typy oscylacji. Na wykresie poziomów białek p53 vs PTEN, chmura punktów komórek o blokadzie cy-



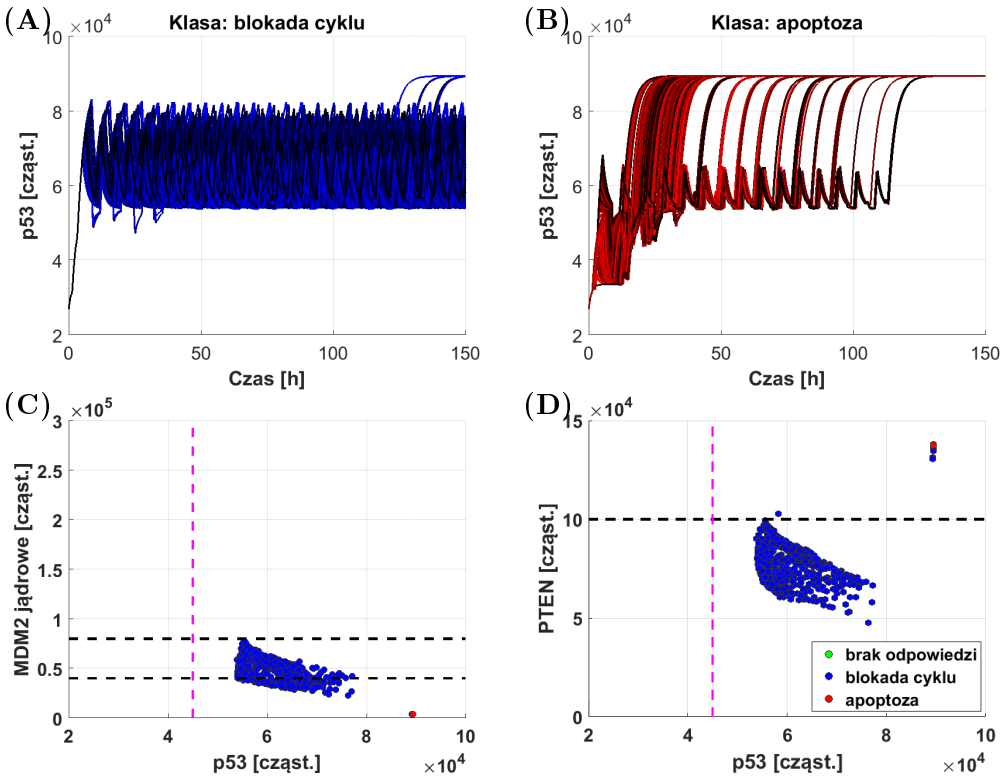
Rysunek 5.12: Odpowiedź populacji heterogenicznej (SD = 20% θ_P) na wymuszenie $R = 1\,a.u.$ (A) Przebiegi czasowe subpopulacji nie aktywującej odpowiedzi; (B) Przebiegi czasowe subpopulacji aktywującej blokadę cyklu komórkowego; (C) Końcowy poziom p53 vs poziom jądrowego MDM2 z podziałem na klasy; (D) Końcowy poziom p53 vs PTEN z podziałem na klasy; (przerywana linia – wartości progowe, różowy – średnia wartość θ_P w populacji)

klu znajduje się w większości poniżej wartości progowej białka PTEN (Rysunek 5.13D). Komórki, w których poziom PTEN jest wysoki to komórki apoptotyczne lub te w których apoptoza będzie aktywowana w najbliższych godzinach (zaproponowany klasyfikator sprawdza poziom białka w ostatnich 10 godzinach). Chmura punktów stworzonych przez komórki apoptotyczne jest bardzo mała, komórki mają praktycznie takie same wartości białek — wysoki poziom p53 i PTEN oraz niski poziom MDM2 (Rysunek 5.13C i D).

Pod wpływem dużego poziomu stresu ($R = 9\,a.u.$) w zdecydowanej większości komórek jest aktywowana apoptoza. Na wykresach czasowych widoczny jest wpływ wartości progowej białka p53 na zróżnicowanie czasu aktywacji apoptozy: od 20 godzin po zadziałaniu czynnika stresowego do końca symulacji (Rysunek 5.14B). W populacji tej występuje również klasa komórek z blokadą cyklu komórkowego. Występują w nich oscylacje na wysokim poziomie białka p53, co wynika z szybkiego tempa degradacji białka MDM2 (Rysunek 5.14A). Chmura końcowych poziomów białka jest zdecydowanie mniejsza niż w układzie z $R = 5\,a.u.$, co wynika z mniejszej amplitudy oscylacji. Chmura komórek oscylujących, jak i ich wartość progowa jest przesunięta na prawo, względem średniej wartości progowej θ_P. Poziom białka MDM2 oscyluje wokół niższej wartości progowej θ_{N1}, a w komórkach apoptotycznych poziom białka MDM2 jest bardzo niski (Rysunek 5.14C). Na wykresie końcowych poziomów białka PTEN widoczne jest, że w subpopulacji komórek o zablokowanym cyklu



Rysunek 5.13: Odpowiedź populacji heterogenicznej (SD = 20% θ_P) na wymuszenie $R = 5\,a.u.$; (A) Przebiegi czasowe subpopulacji aktywującej blokadę cyklu komórkowego; (B) Przebiegi czasowe subpopulacji aktywującej apoptozę; (C) Końcowy poziom p53 vs poziom jądrowego MDM2 z podziałem na klasy; (D. Końcowy poziom p53 vs PTEN z podziałem na klasy; (przerywana linia – wartości progowe, różowy – średnia wartość θ_P w populacji)



Rysunek 5.14: Odpowiedź populacji heterogenicznej (SD = 20% θ_P) na wymuszenie $R = 9\,a.u.$; (A) Przebiegi czasowe subpopulacji aktywującej blokadę komórkową; (B) Przebiegi czasowe subpopulacji aktywującej apoptozę; (C) Końcowy poziom p53 vs poziom jądrowego MDM2 z podziałem na klasy; (D) Końcowy poziom p53 vs PTEN z podziałem na klasy; (przerywana linia – wartości progowe, różowy – średnia wartość θ_P w populacji)

poziom PTEN jest niższy od wartości progowej w zdecydowanej większości komórek. W komórkach apoptotycznych poziom PTEN jest powyżej wartości progowej, co świadczy o aktywacji sprzężenia dodatniego. Jednocześnie widocznych jest kilka komórek, które mają wysoki poziom p53 w ostatniej chwili symulacji, ale ze względu na zaproponowany sposób klasyfikacji komórek (czyli analizę ostatnich 10 godzin), nie zostały zakwalifikowane do subpopulacji apoptotycznej (Rysunek 5.14D).

Próg poziomu białka p53, przy jakim następuje aktywacja procesu transkrypcji genów MDM2 i PTEN, ma bardzo duży wpływ na odpowiedź komórki na stres, co widoczne jest poprzez zróżnicowanie typu oraz czasu odpowiedzi na bodźce w analizowanej populacji komórkowej. Na Rysunku 5.15, przedstawiona jest zależność między wartością progową θ_P a wartością minimalną i maksymalną białka p53 w każdej z 10 000 komórek w populacji w ostatnich 10 godzinach symulacji. Ze względu na losowe wartości progu θ_P (rozkład normalny) nie wszystkie wartości progowe mają swoją reprezentację w postaci punktu na wykresie.

Przy niskich dawkach stresu, niskie wartości θ_P skutkują brakiem odpowiedzi. Poziom p53 jest stale powyżej wartości progowej, zatem proces produkcji białka PTEN oraz MDM2 jest cały czas aktywny. Ze względu na wysoki poziom PTEN transport MDM2 do jądra jest stale zmniejszony, jednakże stałe, wysokie tempo produkcji MDM2 oraz niskie tem-

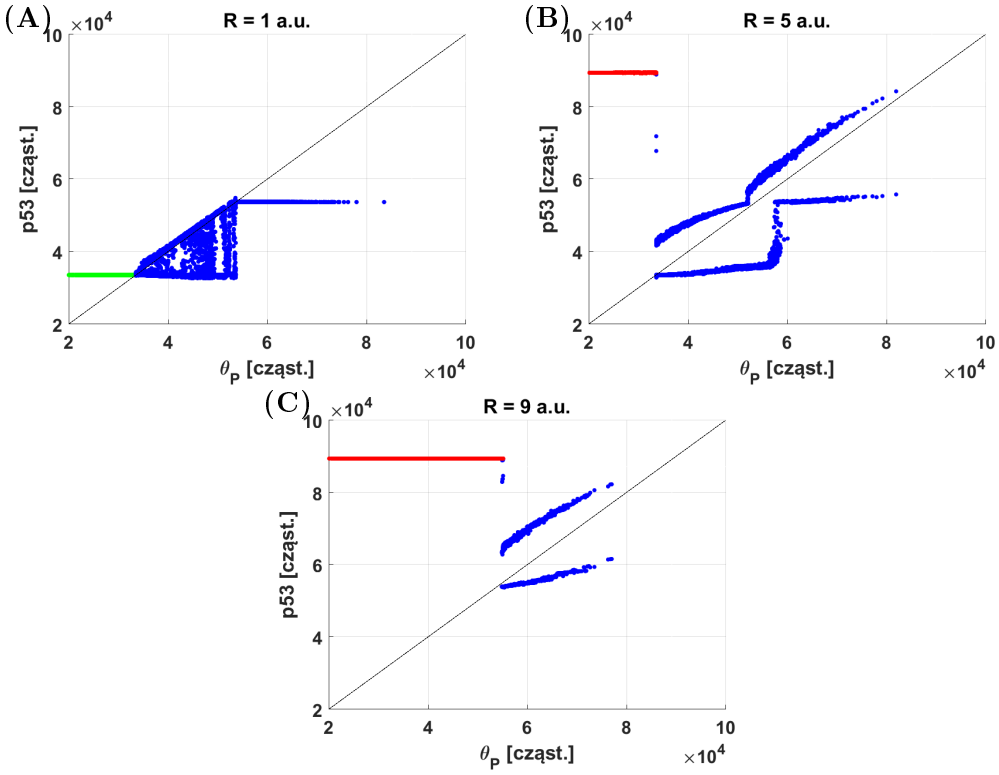
po degradacji (wynikające z niskiego poziomu stresu), skutkuje utrzymaniem wysokiego poziomu MDM2 w jądrze i w efekcie niskim poziomem p53 (Rysunek 5.15A). Co ciekawe oscylacje również nie występują dla wysokich wartości θ_P. Dla $\theta_P > 53700$ cząst. w komórce występuje stały, podwyższony poziom białka p53. Obserwowane zachowanie układu odpowiada występowaniu zwyczajnego punktu stacjonarnego w domenie $\{111\}$, wyznaczonego w podrozdziale 5.4.1. Dla nominalnych wartości progowych basen przyciągania tego punktu jest bardzo niewielki, a startując z warunków początkowych określonych w Tabeli 5.1 trajektoria oscyluje wokół punktu SSP. Zwiększenie wartości progowej θ_P spowodowało zniknięcie punktu SSP, a trajektoria startująca z przyjętych warunków początkowych zmierza do punktu RSP, o średnim poziomie białka p53. W komórkach tych występuje średni poziom MDM2 w jądrze, wynikający z wyłącznie podstawowej, niezależnej od p53 produkcji MDM2 (ze względu na wysoką wartość progową θ_P) oraz podwyższonej degradacji MDM2 w warunkach stresowych. Średni poziom jądrowego MDM2 skutkuje obniżeniem tempa degradacji p53, w stosunku do szybkiego tempa w komórkach z wysokim MDM2, przez co poziom białka p53 w komórce jest podwyższony. Podwyższenie poziomu nie jest jednak wystarczające, aby aktywować sprzężenie ujemne w układzie (Rysunek 5.15A, wartości $\theta_P > 53700$ cząst.).

Dla wyższych dawek stresu populacja apoptotyczna występuje przy niskich wartościach progowych θ_P. Oznacza to, że aktywacja procesu apoptozy jest łatwiejsza w komórkach, w których już niewielkie stężenie p53 jest wystarczające, aby aktywować produkcję białek zależnych od niego transkrypcyjnie. W populacji potraktowanej średnim stresem wraz ze wzrostem wartości progowej zmienia się zakres oscylacji poziomu białka p53:

- $\theta \in [33\,600; 51\,500]$ cząst. – niski zakres oscylacji p53 – poziom MDM2 oscyluje pomiędzy średnim a wysokim;
- $\theta \in (51\,500; 58\,200]$ cząst. – średni zakres oscylacji p53 – poziom MDM2 oscyluje z niskiego na wysoki;
- $\theta > 3.82 \cdot 10^4$ cząst. – wysoki zakres oscylacji p53 – MDM2 oscyluje pomiędzy średnim a niskim poziomem.

Jest to widoczne na Rysunku 5.15B. W komórkach potraktowanych wysoką dawką stresu, w których wartość progowa jest niższa niż 55 000 cząst., aktywowana jest apoptoza. Jeżeli do aktywacji produkcji białek jest potrzebny wyższy poziom p53, w komórce występują jedynie oscylacje, co świadczy o poprawnym działaniu pętli sprzężenia ujemnego, ale braku aktywacji sprzężenia dodatniego, w wyniku zbyt niskiej produkcja PTEN (Rysunek 5.15C).

Wysoka wartość progowa θ_P obniża zdolność komórki do aktywowania prawidłowej odpowiedzi na czynniki stresowe, a w przypadku znacznych uszkodzeń utrudnia aktywację śmierci komórki. Komórki o wysokiej wartości progowej to np. komórki ze zmutowanym jednym z alleli genu p53. W komórkach takich p53 nie jest w pełni funkcjonalne lub tylko jego część ma zdolność do aktywacji transkrypcji. Inne nieprawidłowości dające podobny efekt to zaburzenie translokacji p53 do jądra lub zaburzenie procesu jego fosforylacji, ponieważ również zwiększają granicę poziomu białka w komórce, przy którym możliwa jest aktywacja transkrypcji genów od niego zależnych. W rezultacie potrzebne jest wyższe stężenie p53, aby aktywować produkcję białek związanych z regulacją poziomu p53 i aktywacją odpowiedzi na stres — produkcją białek odpowiedzialnych za blokadę cyklu i apoptozę. Z tego powodu komórki te, pomimo uszkodzeń, nie będą usuwane z organizmu, co może prowadzić do dalszych mutacji i rozwoju nowotworu.



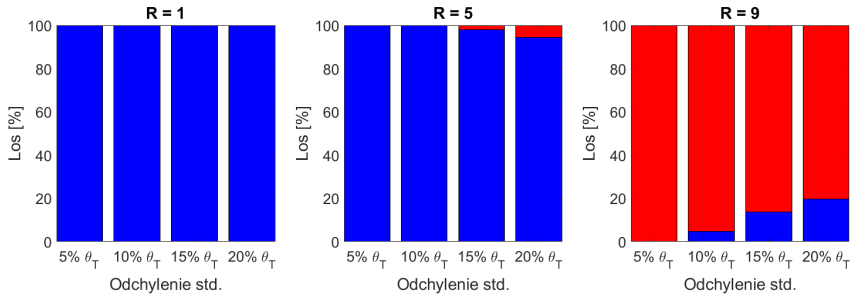
Rysunek 5.15: Wpływ wartości progowej θ_P na zakres odpowiedzi komórki; (A) Mała dawka stresu ($R = 1\,a.u.$); (B) Średnia dawka stresu ($R = 5\,a.u.$); (C) Wysoka dawka stresu ($R = 9\,a.u.$)

Niekorzystny wpływ na funkcjonowanie komórki ma również niska wartość progowa dla białka p53, ponieważ może skutkować stałą aktywacją genów zależnych od niego transkrypcyjnie. W rezultacie zarówno dodatnia, jak i ujemna pętla nie działa poprawnie, przez co komórka nie ma możliwości aktywacji przejściowego wzrostu poziomu białka p53, który pozwala na naprawę uszkodzeń. Komórka jest bardzo wrażliwa na uszkodzenia, a nawet niewysokie dawki indukują apoptozę. Rzeczywiste organizmy dotknięte taką wadą zazwyczaj umierają na etapie płodu.

5.5.2 Wpływ położenia progu θ_T na odpowiedź komórki

Proces zahamowania transportu MDM2 do jądra może zachodzić przy różnych stężeniach białka PTEN w układzie. Białko PTEN jest pierwszym elementem kaskady związanej z blokadą transportu MDM2 do cytoplazmy. PTEN dezaktywuje białko PIP3 hydrolizując go do PIP2, które jest niezdolne do aktywacji białka AKT. Kinaza AKT jest odpowiedzialna za fosforylację MDM2, która z kolei umożliwia transport MDM2 do jądra [88]. Różne położenie progu θ_T pozwala modelować komórki o różnych progach aktywacji redukcji tempa transportu MDM2 do jądra. Takie zjawisko w komórce może wynikać, m.in. z różnego poziomu białka PTEN, potrzebnego do dezaktywacji PIP3 w odpowiednim stopniu, wynikającym z różnej ilości tego białka (lub białka AKT) w komórkach.

W celu sprawdzenia wpływu zróżnicowania położenia progu, przy którym następuje ograniczenie transportu MDM2 do jądra, na odpowiedź komórkową po wystąpieniu stre-

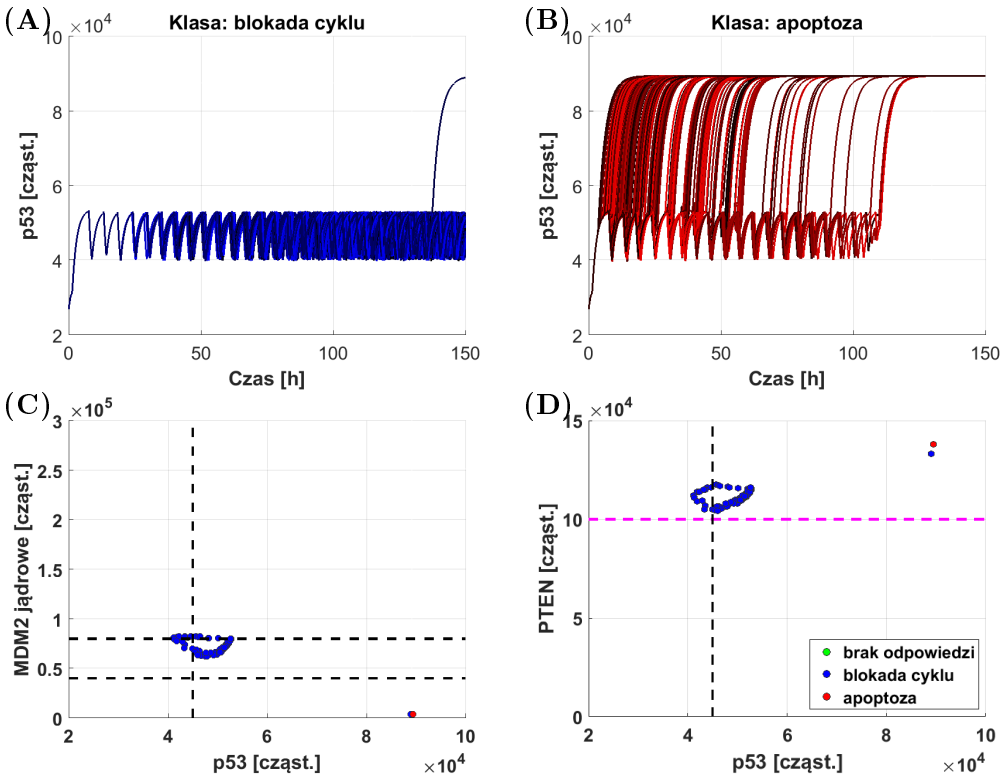


Rysunek 5.16: Zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej w populacji heterogenicznej pod względem lokalizacji θ_T na różne dawki wymuszenia

su zewnętrznego, stworzona została populacja 10 000 komórek o losowych wartościach θ_T (analogicznie jak we wcześniejszej sekcji).

Zróżnicowanie wartości progu θ_T ma wpływ głównie na odpowiedź apoptotyczną, ponieważ wpływa on na aktywację sprzężenia dodatniego (Rysunek 5.16). W układzie po zadziałaniu $R = 1\,a.u.$ nie zaobserwowano zróżnicowania populacji, a jedynie nieznaczne zróżnicowanie okresów oscylacji. Również po zadziałaniu $R = 5\,a.u.$ zróżnicowanie populacji jest niewielkie. Z tego względu poniżej przedstawiono wyłącznie wyniki symulacji układu poddanego działaniu dużego stresu ($R = 9\,a.u.$), o wartościach θ_T losowanych z rozkładu normalnego z odchyleniem standardowym równym 20% wartości progowej θ_T. W takim układzie pojawiają się dwie subpopulacje — w jednej aktywowana jest blokada cyklu komórkowego, a w drugiej apoptoza (Rysunek 5.17A). W subpopulacji apoptotycznej oscylacje w początkowym etapie odpowiedzi mają taką samą amplitudę i maksimum jak w subpopulacji o zatrzymanym cyklu (różnią się jedynie okresem), a komórki różnią się miedzy sobą czasem podjęcia decyzji apoptotycznej (Rysunek 5.17B). Czas aktywacji apoptozy jest ściśle związany z wartością θ_T, ponieważ zwiększenie wartości progowej powoduje wydłużenie czasu, jaki jest potrzebny na skumulowanie białka PTEN na poziomie wystarczającym, aby aktywować blokadę transportu MDM2. Ze względu na regularność oscylacji poziomów białek w komórkach zatrzymanych, chmura punktów końcowych wartości białka tworzy okrąg (Rysunek 5.17 C i D). Na Rysunku 5.17D przedstawiona populacja o zablokowanym cyklu komórkowym posiada stosunkowo wysoki poziom białka PTEN, nadal jednak niższy niż wartość progowa θ_T (co widoczne jest na Rysunku 5.18B). Należy jednak mieć na uwadze, że wartość progowa PTEN oznaczona na wykresie na różowo to średnia wartość θ_T w populacji, a dla konkretnych komórek przyjmuje ona różne wartości. W subpopulacji komórek zatrzymanych losowa wartość θ_T jest powyżej poziomu PTEN (Rysunek 5.18B), przez co transport MDM2 do jądra przebiega z normalnym, szybkim tempem. Subpopulacja apoptotyczna tworzy jeden punkt z wysokim poziomem p53 oraz PTEN i niskim poziomem jądrowego MDM2 (czerwona kropka na Rysunku 5.17C i D). Obok niej znajduje się również niebieska kropka oznaczająca komórkę, w której proces apoptozy został rozpoczęty, ale decyzja apoptotyczna została podjęta w czasie krótszym niż analizowane ostatnie 30 godzin, przez co jest ona zaklasyfikowana do grupy komórek zatrzymanych.

Zróżnicowanie lokalizacji wartości progowej θ_T nie wpływa na wartość maksymalną oraz amplitudę oscylacji, ale wpływa na okres oscylacji i czas podjęcia decyzji apoptotycznej. Powoduje również zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej. Dla niższych wartości

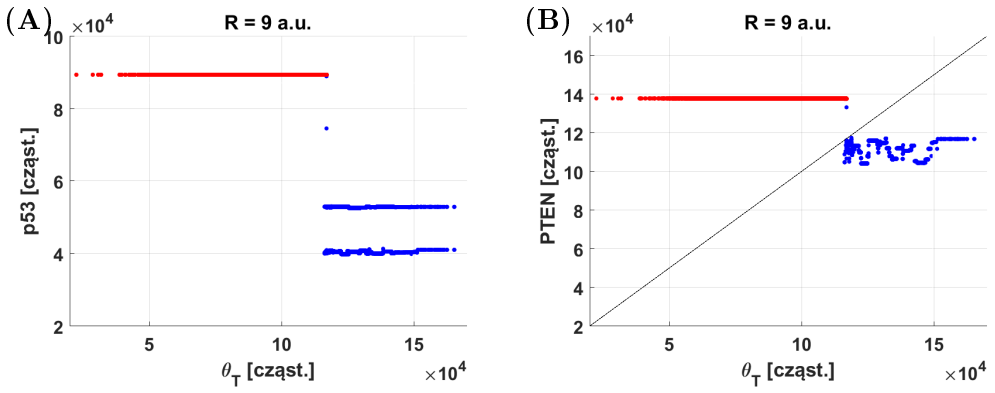


Rysunek 5.17: Odpowiedź populacji heterogenicznej pod względem aktywacji transportu MDM2 (SD = 20% θ_T) na wymuszenie $R = 9\,a.u.$; (A) Przebiegi czasowe subpopulacji aktywującej blokadę komórkową; (B) Przebiegi czasowe subpopulacji aktywującej apoptozę; (C) Końcowy poziom p53 vs poziom jądrowego MDM2 z podziałem na klasy; (D) Końcowy poziom p53 vs PTEN z podziałem na klasy; (przerywana linia – wartości progowe, różowy – średnia wartość θ_P w populacji)

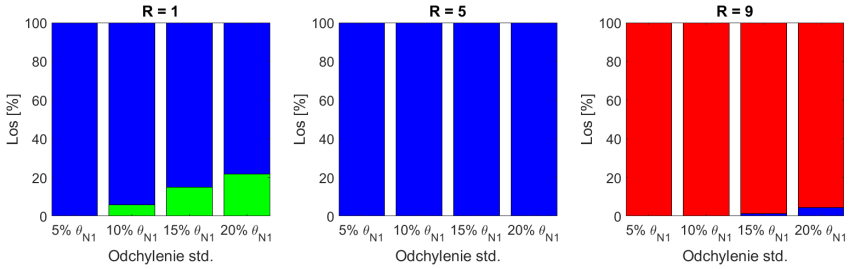
progowych θ_T proces aktywacji apoptozy zachodzi łatwiej, ponieważ już niskie poziomy PTEN powodują ograniczenie transportu MDM2 do jądra, a w konsekwencji zmniejszenie degradacji p53. Wraz ze wzrostem θ_T w komórce, aktywacja pętli sprzężenia dodatniego jest trudniejsza, dlatego nawet przy dużych uszkodzeniach występują stałe oscylacje. Zależność poziomu białka p53 od wartości progowej θ_T jest przedstawiona na Rysunku 5.18, gdzie widać podział populacji na dwie części w zależności od wartości progowej. Widoczna jest również regularność oscylacji. Na granicy pomiędzy subpopulacją apoptotyczną a zatrzymaną widać komórkę, która w ostatnich godzinach symulacji podjęła decyzję apoptotyczną, przez co poziom p53 ma wartość pośrednią (Rysunek 5.18 niebieska kropka dla $\theta_T = 1.17 \cdot 10^5$).

5.5.3 Wpływ położenia progów θ_{N1} i θ_{N2} na odpowiedź komórki

Kolejne analizowane wartości progowe w modelu dotyczą jądrowego MDM2 (N) i określają próg aktywacji zwiększenia tempa degradacji p53. W zależności od poziomu MDM2, tempo degradacji p53 ma trzy różne wartości. Analogicznie jak w poprzednich przypadkach, komórki ze względu na stężenia pozostałych czynników biorących udział w reakcji (takich jak



Rysunek 5.18: Wpływ wartości progowej θ_T na zakres odpowiedzi komórki; (A) Poziom białka p53; (B) Poziom białka PTEN

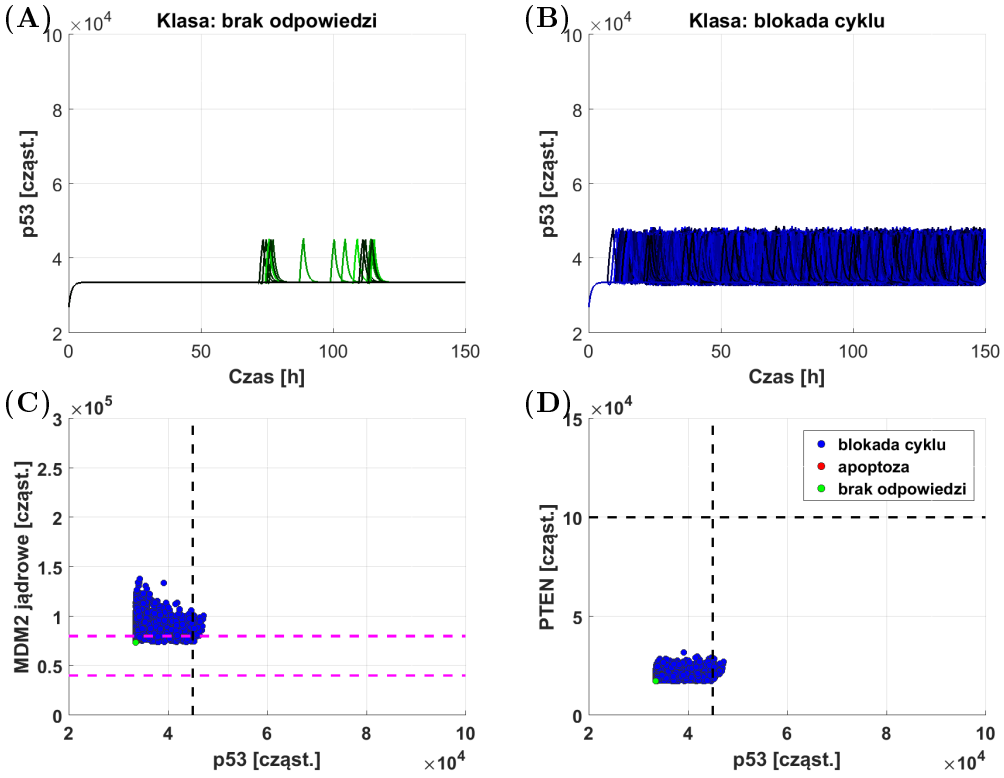


Rysunek 5.19: Zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej na różne dawki wymuszenia w populacji heterogenicznej pod względem lokalizacji θ_{N1}

np. ubikwityna) mogą być mniej lub bardziej wrażliwe na obecność MDM2. Dla zmiennej N istnieją dwie wartości progowe, po przekroczeniu każdej z nich tempo degradacji p53 wzrasta o około 60%. W niniejszych badaniach wprowadzono założenie, że dystans między wartościami progowymi jest zachowany: randomizowane jest tylko położenie pierwszej wartości progowej, a wartość drugiej wartości progowej jest wyliczana.

Na Rysunku 5.19 widoczne jest, że największe zróżnicowanie populacji występuje przy niskich oraz przy wysokich poziomach stresu. Dla $R = 1\,a.u.$ i odchylenia standardowego 20% wartości nominalnej θ_{N1}, subpopulacja nie aktywująca odpowiedzi wynosi 22%. Natomiast populacja po zadziałaniu $R = 5\,a.u.$ jest homogeniczna, dlatego nie będzie rozważana w dalszej części. W przypadku dużego stresu ($R = 9\,a.u.$) w populacji o dużym zróżnicowaniu pojawia się subpopulacja, w której jest blokowany cykl komórkowy, ale wynosi ona zaledwie 4.5% wszystkich komórek.

W przypadku niskiego stresu ($R = 1\,a.u.$), duże zróżnicowanie populacji powoduje podział na dwie klasy: komórki nie aktywujące odpowiedzi oraz aktywujące blokadę cyklu komórkowego. Oscylacje p53, występujące w komórkach, mają stałą wartość minimalną i maksymalną, ale różnią się okresem, który uzależniony jest od stężenia MDM2 aktywującego degradację (Rysunek 5.20B). W nielicznych komórkach normalnych pojawia się pik poziomu p53, ale ze względu na długi okres oscylacji nie zostały one zakwalifikowane do grupy komórek zatrzymanych (Rysunek 5.20A). Komórki normalne mają bardzo podobne wartości końcowe białek (patrz zielony punkt Rysunek 5.20C i D), natomiast komórki zatrzymane tworzą chmurę punktów na przecięciu wartości progowych θ_{N1} i θ_P przy niskich



Rysunek 5.20: Odpowiedź populacji heterogenicznej pod względem aktywacji degradacji p53 (SD = 20% θ_{N1}) na wymuszenie $R = 1\,a.u.$; (A) Przebiegi czasowe subpopulacji nie aktywującej odpowiedzi; (B) Przebiegi czasowe subpopulacji aktywującej blokadę cyklu komórkowego; (C) Końcowy poziom p53 vs poziom jądrowego MDM2 z podziałem na klasy; (D) Końcowy poziom p53 vs PTEN z podziałem na klasy. (przerywana linia – wartości progowe, różowy – średnia wartość θ_{N1} i θ_{N2} w populacji)

poziomach T (Rysunek 5.20C i D).

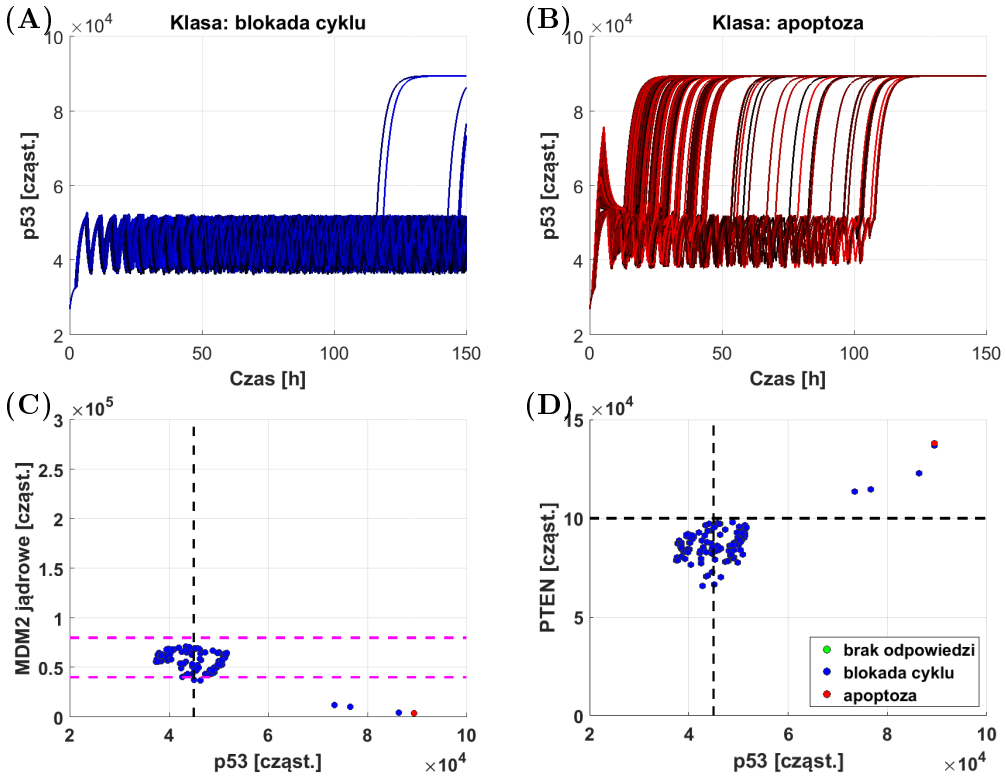
Przy wysokiej dawce stresu ($R = 9\,a.u.$) i przy dużej heterogeniczności populacji (20% θ_{N1}), część komórek aktywuje blokadę cyklu komórkowego a część apoptozę. Przebiegi czasowe obu klas są podobne do odpowiedzi obserwowanych przy randomizowaniu aktywacji blokady transportu MDM2 do jądra (por. Rysunek 5.21A i B vs Rysunek 5.17A i B). W przebiegach czasowych występuje ten sam zakres i amplituda oscylacji, a także występuje przesunięcie fazowe oscylacji i zróżnicowanie czasu aktywacji apoptozy. W komórkach aktywujących blokadę cyklu komórkowego obserwuje się znaczące podwyższenie poziomu białka PTEN (Rysunek 5.21D) oraz obniżenie poziomu jądrowego MDM2 (Rysunek 5.21C), w stosunku do populacji potraktowanej niższą dawką. Na wykresach (Rysunek 5.21C i D) widoczne są również komórki, w których w ostatnich godzinach symulacji była aktywowana apoptoza, ale nie zostały zakwalifikowane do grupy komórek apoptotycznych, ze względu na analizowanie jedynie ostatnich 10 godzin symulacji.

W komórce łatwo aktywującej degradację p53, nie obserwuje się odpowiedzi na małą dawkę stresu, natomiast wraz ze wzrostem wartości progowej dla θ_{N1}, w komórce aktywowane jest sprzężenie ujemne i obserwuje się oscylacje (Rysunek 5.22A). Brak odpowiedzi dla niższych wartości θ_{N1} wynika z bardzo szybkiej degradacji p53 nawet przy stosunkowo

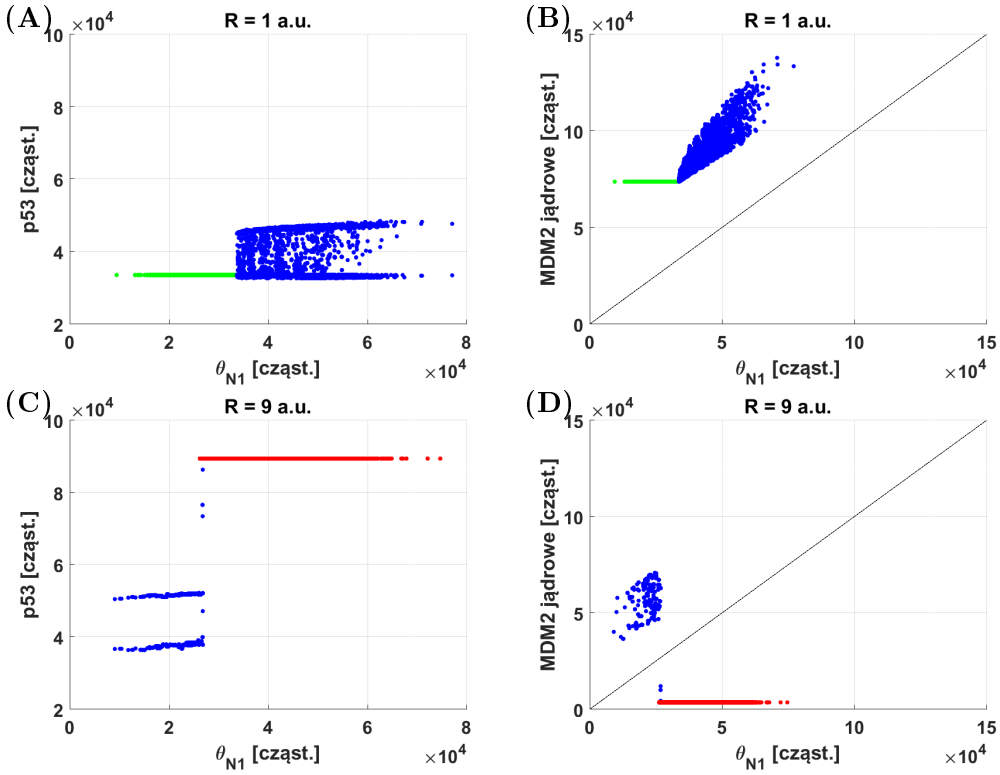
niskich stężeniach MDM2, przez co jego poziom nie jest wystarczający, aby aktywować ekspresję genów (Rysunek 5.20A). Dla wyższych dawek stresu wraz ze wzrostem wartości progowej θ_{N1}, wzrasta zdolność komórki do aktywacji odpowiedzi apoptotycznej (Rysunek 5.22C), co wynika z faktu, że akumulacja białka p53 w komórce łatwo aktywującej jego degradację jest utrudniona. Niezależnie od dawki stresu, oscylacje poziomu MDM2 są powyżej pierwszej wartości progowej θ_{N1}, wokół drugiego progu jądrowego MDM2 (Rysunek 5.22B i D).

5.5.4 Zróżnicowanie aktywacji wszystkich procesów w modelu

W realistycznym modelu populacji komórek należy uwzględnić zróżnicowanie wartości progowych dla wszystkich analizowanych procesów. Symulacje zostały wykonane podobnie jak we wcześniejszych systemach, przy czym wszystkie wartości progowe były losowane z rozkładu normalnego o średniej równej danej wartości progowej i odchyleniu standardowym równym procentowej części wartości progowej. W rezultacie odpowiedź populacji jest zróżnicowana zarówno przy niskiej, średniej, jak i wysokiej dawce stresu (Rysunek 5.23A). W populacji o dużych odchyleniach standardowych (20% wartości progowych) potraktowa-



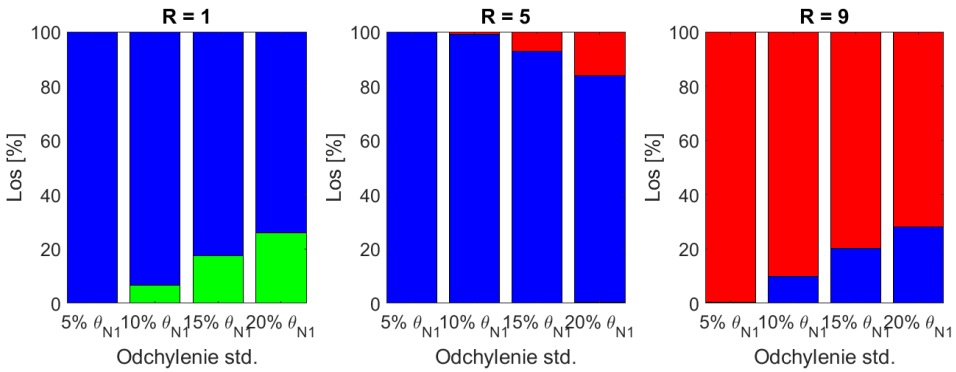
Rysunek 5.21: Odpowiedź populacji heterogenicznej pod względem aktywacji degradacji p53 (SD = 20% θ_{N1}) na wymuszenie $R = 9\,a.u.$; (A) Przebiegi czasowe subpopulacji nie aktywującej odpowiedzi; (B) Przebiegi czasowe subpopulacji aktywującej blokadę cyklu komórkowego; (C) Końcowy poziom p53 vs poziom jądrowego MDM2 z podziałem na klasy; (D) Końcowy poziom p53 vs PTEN z podziałem na klasy; (przerywana linia – wartości progowe, różowy – średnia wartość θ_{N1} i θ_{N2} w populacji)



Rysunek 5.22: Wpływ wartości progowej θ_{N1} na zakres odpowiedzi komórki; (A) Poziom białka p53 dla $R = 1\,a.u.$; (B) Poziom białka jądrowego MDM2 dla $R = 1\,a.u.$; (C) Poziom białka p53 dla $R = 9\,a.u.$; (D) Poziom białka jądrowego MDM2 dla $R = 9\,a.u.$;

nej stresem $R = 9\,a.u.$, występują wszystkie trzy różne typy odpowiedzi. Subpopulacja nie aktywująca odpowiedzi jest bardzo niewielka (Rysunek 5.24A). Oscylacje w populacji zatrzymanej są bardzo zróżnicowane, zarówno pod względem okresu, jak i amplitudy drgań (Rysunek 5.24B). Również początkowe oscylacje w subpopulacji komórek apoptotycznych są bardzo zróżnicowane (Rysunek 5.24C). Wykres końcowych poziomów białka p53 oraz MDM2 pokazuje wysoki poziom białka MDM2 i niski p53 w komórce normalnej i przeciwnie: niski poziom MDM2 i wysoki p53 w komórkach apoptotycznych. Chmura punktów stworzona przez populacje oscylującą jest bardzo duża i rozpościera się od bardzo niskich do bardzo wysokich poziomów p53 (Rysunek 5.24D). Na wykresie przedstawiającym poziom PTEN vs p53 widoczne jest, że chmura punktów stworzonych przez oscylujące komórki rozpościera się wokół średniej wartości progowej θ_T, natomiast zarówno komórki zatrzymane, jak i apoptotyczne znajdują się powyżej niej (Rysunek 5.24E).

Na Rysunku 5.24F przedstawiona jest decyzja komórki, jaka została podjęta dla danych wartości progowych θ_P, θ_{N1} i θ_T przy wymuszeniu równym 9 a.u. W populacji widoczna jest mała subpopulacja komórek, które nie aktywowały odpowiedzi, pomimo dużych uszkodzeń wywołanych przez stres. Komórki nie aktywujące odpowiedzi mają niski próg aktywacji genów (mała wartość θ_P), wysoki próg aktywacji blokady transportu MDM2 do jądra (duża wartość θ_T) oraz niski próg aktywacji degradacji p53 (mała wartość θ_{N1}) (Rysunek 5.24 F). Komórki takie będą dzieliły się pomimo uszkodzeń DNA, przez co mutacje będą przekazywane komórkom potomnym, co może prowadzić do powstawania nowotworów. Natomiast



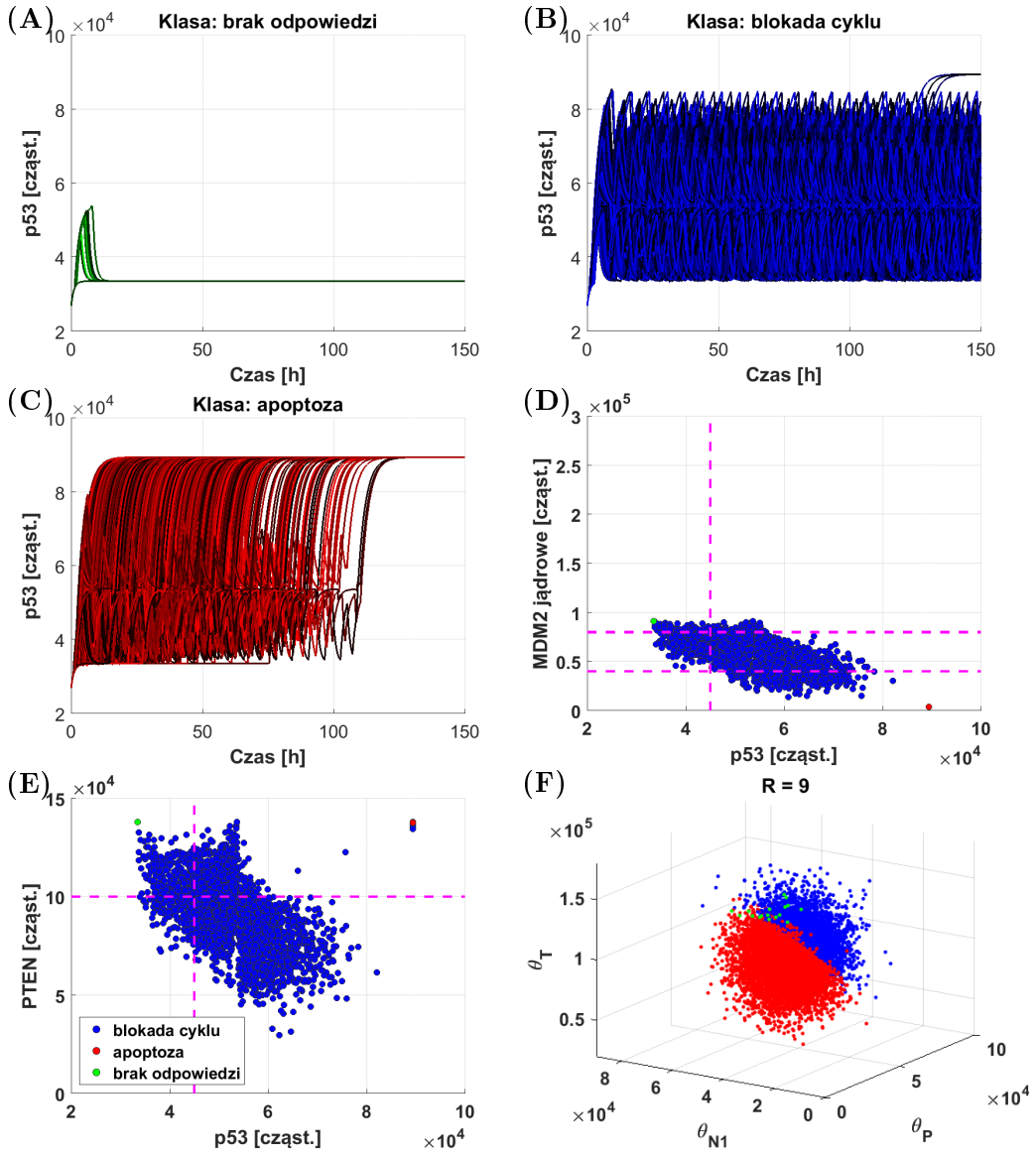
Rysunek 5.23: Zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej w populacji heterogenicznej pod względem wszystkich wartości progowych na różne dawki wymuszenia

komórki apoptotyczne posiadają niskie wartości progowe dla θ_P i θ_T oraz wysokie dla θ_{N1} (Rysunek 5.23), co jest zgodne z wynikami uzyskanymi we wcześniejszych podpunktach.

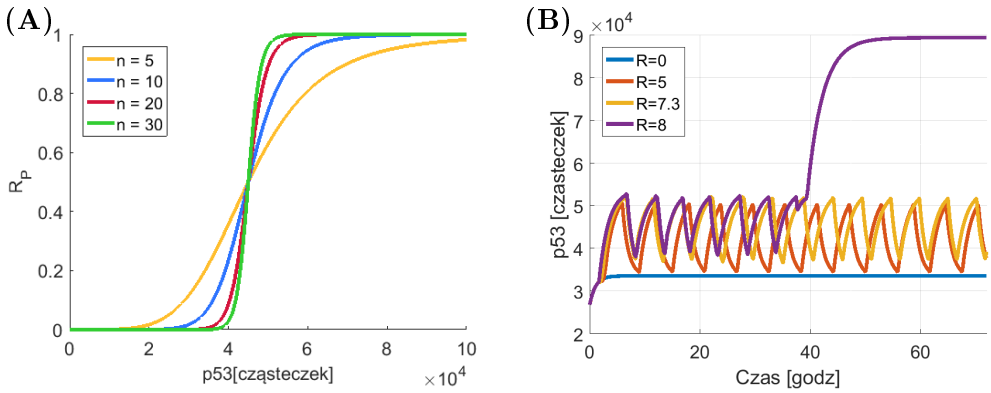
Otrzymane wyniki symulacji dla modelu modułu regulatorowego białka p53 można odnieść do wyników eksperymentów biologicznych opublikowanych przez X. Chena i in. [89]. Analizując przebiegi czasowe pojedynczych komórek autorzy wykonali podział populacji na 4 różne grupy: a) komórki z oscylującym p53 aktywujące blokadę cyklu, b) komórki z oscylującym p53 aktywujące śmierć komórkową, c) komórki z monotonicznym wzrostem p53 aktywujące blokadę cyklu komórkowego oraz d) komórki z monotonicznym wzrostem p53 aktywujące apoptozę. Dominujący charakter odpowiedzi u komórek apoptotycznych to monotoniczny wzrost, a u komórek aktywujących blokadę cyklu to oscylacje, jednak, szczególnie przy średnich dawkach stresu, obserwuje się występowanie komórek o atypowym zachowaniu. W wynikach symulacyjnych również występują różne typy odpowiedzi w danej klasie komórek. Populacja o zróżnicowanej lokalizacji θ_P, pod wpływem niskiej dawki stresu dzieli się na subpopulacje komórek zatrzymanych — oscylujących oraz o stałym podwyższonym poziomie p53 (Rysunek 5.15 A). Natomiast w tej samej populacji komórek po zadziałaniu wyższymi dawkami stresu pojawia się populacja apoptotyczna, w której obserwuje się oscylacje (gasnące i rosnące do wysokich poziomów p53) (Rysunek 5.13B oraz Rysunek 5.14B). Jednocześnie występują również komórki, w których w początkowych chwilach zachodzą gwałtowne zmiany poziomu białka, a następnie około 15 godziny po zadziałaniu stresem następuje wzrost poziomu p53 do wysokich wartości (Rysunek 5.14B).

5.6 Model szlaku regulatorowego białka p53 z losowym przełączeniem

Zjawisko losowej aktywacji i dezaktywacji procesów wewnątrzkomórkowych zostało omówione w podrozdziale 3.5. W celu wprowadzenia losowości procesów aktywacji i dezaktywacji, modelowanych w analizowanym układzie jako przełączenia wartości parametrów, model modułu regulatorowego białka p53 zmodyfikowano poprzez dodanie czterech funkcji prawdopodobieństwa. Funkcje te opisują prawdopodobieństwo, że poszczególne procesy przy danej liczbie cząsteczek czynnika regulatorowego są aktywny. Funkcje te mają następującą



Rysunek 5.24: Odpowiedź populacji heterogenicznej pod względem lokalizacji wszystkich analizowanych progów (SD = 20% θ) na wymuszenie 9 $a.u.$; (A) Przebiegi czasowe subpopulacji nie aktywującej odpowiedzi; (B) Przebiegi czasowe subpopulacji aktywującej blokadę cyklu komórkowego; (C) Przebiegi czasowe populacji apoptotycznej; (D) Końcowy poziom p53 vs poziom jądrowego MDM2 z podziałem na klasy; (E) Końcowy poziom p53 vs PTEN z podziałem na klasy (przerywana linia – wartości progowe, różowy średnia wartość progów w populacji) (F) Zależność między wartościami progowymi θ_P, θ_{N1} i θ_T a odpowiedzią komórki



Rysunek 5.25: (A) Wartość funkcji prawdopodobieństwa dla różnych wartości parametru n dla progu θ_P; (B) Deterministyczna odpowiedź układu na różne wartości wymuszenia

postać:

$$r(P) = \frac{P^n}{P^n + \theta_P^n}, \tag{5.94}$$

$$r(N1) = \frac{N^n}{N^n + \theta_{N1}^n}, \tag{5.95}$$

$$r(N2) = \frac{N^n}{N^n + \theta_{N2}^n}, \tag{5.96}$$

$$r(T) = \frac{T^n}{T^n + \theta_T^n}. \tag{5.97}$$

Każda z powyższych funkcji przyjmuje wartości od 0 do 1 i ma kształt sigmoidalny. Dla wartości progowej θ_P kształt funkcji prawdopodobieństwa jest przedstawiony na Rysunku 5.25A. Aby ocenić czy dany proces jest aktywny czy nie, losuje się liczbę z rozkładu równomiernego w zakresie [0,1] – jeśli wylosowana wartość jest mniejsza od wartości funkcji w danym stanie układu to proces jest aktywny. Od parametru n zależy skośność funkcji prawdopodobieństwa. W niniejszej pracy analizowane są cztery wartości współczynnika n: 5, 10, 20 oraz 30. Stosunkowo duże wartości parametru n wynikają z dużego zakresu zmian poziomu białek i pozwalają na zachowanie odpowiednio dużej specyficzności aktywacji procesów. Dla niskich wartości n proces jest bardzo wrażliwy na nawet niewielkie ilości regulatora, dlatego aktywacja procesu może nastąpić również przy liczbie cząsteczek regulatora znacznie mniejszej od wartości progowej. Natomiast dla dużych wartości n, proces jest mniej wrażliwy na obecność enzymu – jest aktywny tylko w układzie z liczbą cząsteczek większą od wartości progowej (patrz kształt funkcji prawdopodobieństwa dla różnych wartości n – Rysunek 5.25A).

Wyniki symulacji modelu z różnymi parametrami n silnie zależą od wymuszenia. W modelu deterministycznym dla szerokiego zakresu wymuszeń występują oscylacje, a dla wymuszenia R większego lub równego 7.78 a.u. układ dąży do punktu stacjonarnego z wysokim poziomem p53. Na Rysunku 5.25B. przedstawione są przebiegi deterministyczne dla różnych wartości wymuszenia, które zostały wybrane do modelowania stochastycznego. Wybrane dawki to: 0 a.u. (układ bez wymuszenia), 5 i 7.3 a.u. (średnie dawki stresu) oraz 8 a.u. (duży stres). Dawka 5 a.u. została wybrana, aby sprawdzić typową odpowiedź

Tabela 5.4: Średnie i odchylenia standardowe końcowego poziomu białka p53 w układzie bez wymuszenia dla różnych wartości n

n	5	10	20	30	jednostka
Średnia	33 597	33 556	33 555	33 557	cząst.
Odchylenie standardowe	84	6	4	1	cząst.

komórki na średnie dawki stresu, natomiast dawka 7.3 a.u. jest niewiele mniejsza od dawki wywołującej apoptozę, i została wybrana, aby sprawdzić, czy losowość przełączeń wpłynie na rodzaj indukowanej odpowiedzi.

Dla modeli stochastycznych wykonano 5 000 symulacji stochastycznych, które odpowiadają jednej populacji komórkowej o danych właściwościach i potraktowanych danym wymuszeniem. Wyniki tych symulacji są przedstawione w kolejnych podrozdziałach.

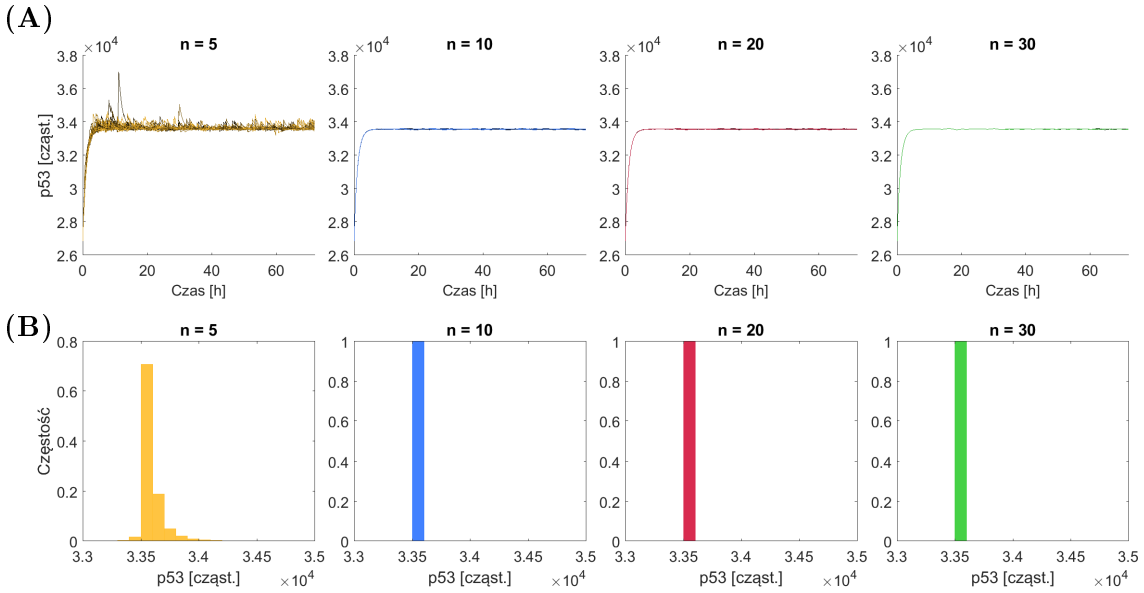
5.6.1 Wyniki otrzymane przy zastosowaniu układu bez wymuszenia

Analizowany układ bez wymuszenia znajduje się w stanie stacjonarnym położonym stosunkowo daleko od wartości progowych. Prawdopodobieństwo aktywacji lub dezaktywacji procesu indukowanej produkcji białka, degradacji p53 lub zahamowania transportu jest niewielkie, dlatego w przebiegach czasowych dla poszczególnych komórek nie występują duże różnice. Oczywiście dla układu o dużym zakresie wrażliwości na obecność czynników regulacyjnych ($n = 5$) występuje największa zmienność wartości białka p53 w czasie, wynikająca z losowej aktywacji i dezaktywacji degradacji p53 przez MDM2 (Rysunek 5.26A). Znaczny spadek zmienności jest widoczny na histogramach, które przedstawiają końcowe wartości poziomu białka p53 a także przy porównaniu odchyleń standardowych w poszczególny próbach: dla $n = 5$ odchylenie standardowe wynosi 84 cząsteczek, a dla $n = 10$ tylko 6 cząsteczek (Rysunek 5.26B). W Tabeli 5.4 przedstawione są średnie i odchylenia standardowe dla populacji o różnych wartościach n.

5.6.2 Wyniki otrzymane przy zastosowaniu układu ze średnimi wartościami wymuszenia

Do analizy wpływu średnich dawek wymuszenia zostały wybrane dwie wartości stresu $R = 5\,a.u.$ i $R = 7.3\,a.u.$ W układzie deterministycznym obie te dawki wywołują powstanie oscylacji białka p53. Ich zakres oraz okres nieznacznie się różnią, ale los komórki w tych systemach jest taki sam – blokada cyklu komórkowego (Rysunek 5.25B).

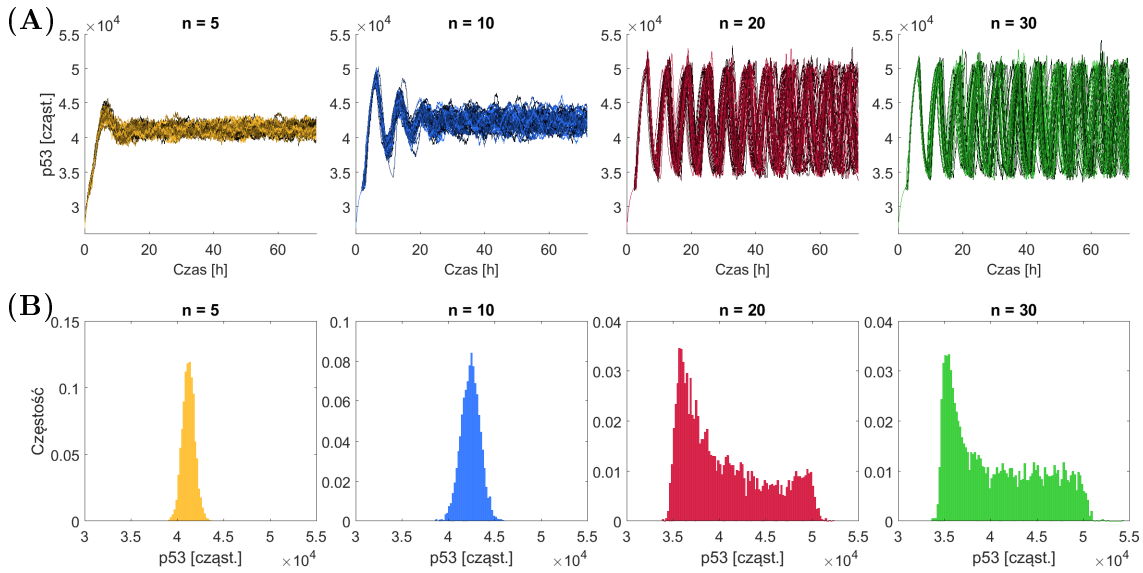
W modelu stochastycznym pod wpływem dawki $R = 5\,a.u.$ w układzie następuje wzrost poziomu p53. Dla $n = 5$ oraz $n = 10$ odpowiedź układu ($t > 20h$) ma charakter białego szumu i nie występują regularne oscylacje (Rysunek 5.27A). Ponadto dla n o mniejszej wartości odchylenie standardowe końcowych poziomów p53 jest mniejsze ponieważ, przełączenia występują częściej, nawet dla poziomów białka odległych od wartości progowych, przez co układ nie ma czasu na odejście od wartości średnich (Rysunek 5.27B). Wraz ze wzrostem wartości n oscylacje poziomu p53 są coraz bardziej regularne, zakres odpowiedzi zbliża się do zakresu odpowiedzi deterministycznej (Rysunek 5.27A). Ze względu na występowanie regularnych oscylacji, zmienia się kształt histogramu wartości końcowych białka p53 w porównaniu do histogramów dla niskich wartości n (Rysunek 5.27B), a jednocześnie znacząco wzrasta odchylenie standardowe – od 663 cząsteczek, dla $n = 5$, do 4891



Rysunek 5.26: Wyniki stochastycznych symulacji modelu białka p53 bez wymuszenia; (A) Przebiegi czasowe poziomu białka p53 w układzie dla różnych wartości n (50 przykładowych przebiegów); (B) Histogram liczby cząsteczek białka p53 w 72 godzinie symulacji (5 000 komórek)

cząsteczek, dla $n = 30$ (Tabela 5.5). Wraz ze wzrostem czasu symulacji, najprawdopodobniej oscylacje uległyby całkowitej desynchronizacji i histogram miałby kształt zbliżony do rozkładu równomiernego.

Dla wymuszenia $R = 7.3\,a.u.$ w układzie deterministycznym nadal występują niegasnące oscylacje, o nieco większej amplitudzie oraz mniejszym okresie niż dla $R = 5\,a.u.$ (Rysunek 5.25) W modelu stochastycznym dla tej wartości wymuszenia obserwuje się duże zróżnicowanie odpowiedzi układów o różnej wrażliwości na obecność czynników regulatorowych. Przy dużej wrażliwości komórek na nawet niewielkie stężenie regulatora ($n = 5$), w układzie wzrasta poziom białka p53, a następnie ulega nieregularnym wahaniom, wynikającym z losowej aktywacji procesów. Histogram wartości końcowych białka p53 ma kształt zbliżony do rozkładu normalnego i stosunkowo niewielkie odchylenie standardowe o wartości 818 cząsteczek (Rysunek 5.28A i B, pierwsza kolumna). Dla układu o mniejszej wrażliwości na liczność cząsteczek regulatora ($n = 10$), odpowiedź nadal ma charakter białego szumu, ale poziom p53 rośnie szybciej, co z pewnością pociąga za sobą wzrost poziomu PTEN, dzięki czemu około 60 godziny od zadziałania wymuszenia następuje aktywacja zahamowania transportu MDM2 i gwałtowne nagromadzenie p53 (Rysunek 5.28A, 2 kolumna). W końcowej chwili symulacji zakres p53 jest bardzo duży i na podstawie kształtu histogramu możemy wydzielić dwa maksima, świadczące o występowaniu dwóch subpopulacji. Pierwsze maksimum przypada na liczebność białka p53 równą około 57 000 i odpowiada komórkom, w których aktywna jest blokada cyklu. Drugie maksimum znajduje się przy wyższych poziomach białka (około 85 000 cząsteczek) co oznacza aktywację apoptozy (Rysunek 5.28B, druga kolumna). W dłuższym horyzoncie czasowym najprawdopodobniej we wszystkich komórkach nastąpiłby wzrost poziomu białka p53, tak jak ma to miejsce dla $n = 20$. W układzie tym również występują oscylacje, ale ich amplituda się

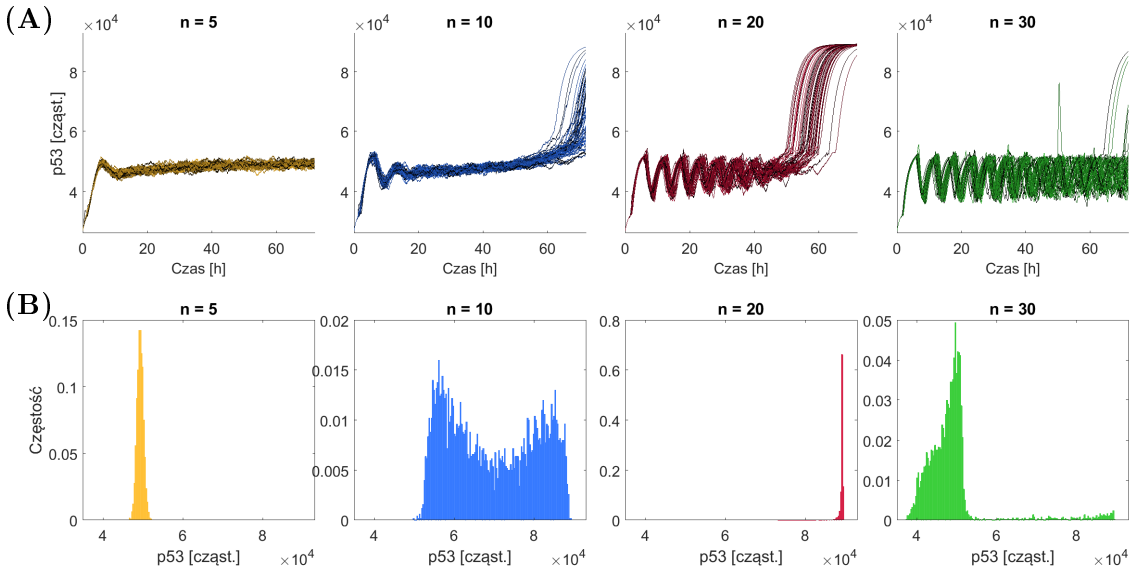


Rysunek 5.27: Wyniki stochastycznych symulacji modelu białka p53 z wymuszeniem $R = 5\,a.u.$; (A) Przebiegi czasowe poziomu białka p53 w układzie dla różnych wartości n (50 przykładowych przebiegów); (B) Histogram liczby cząsteczek białka p53 w 72 godzinie symulacji (5 000 komórek)

zmniejsza. Około 40 godzin po podaniu wymuszenia, poziom p53 jest stale podwyższony, co pozwala na aktywację pętli sprzężenia dodatniego i dalszy wzrost poziomu białka p53. Odpowiedź populacji jest bardzo jednorodna – po 72 godzinach we wszystkich komórkach poziom p53 jest bardzo wysoki, a odchylenie standardowe niskie (patrz Rysunek 5.28 A i B, trzecia kolumna oraz Tabela 5.5). W układzie bardzo mało wrażliwym na szeroki zakres stężeń cząsteczek regulatorowych ($n = 30$) oscylacje poziomu białka są bardzo regularne, a okresowe zmiany poziomu białka p53 z niskiego na wysoki, utrudniają nagromadzenie białka PTEN i aktywację sprzężenia dodatniego. Również w tym przypadku populacja dzieli się na dwie części: w bardziej licznej subpopulacji występują oscylacje, świadczące o blokadzie cyklu natomiast w małej podgrupie komórek aktywowana jest apoptoza (Rysunek 5.28A i B, czwarta kolumna). W dłuższym horyzoncie czasowym najprawdopodobniej we wszystkich komórkach wystąpiłby ostatecznie wzrost poziomu p53 w stopniu umożliwiającym aktywację apoptozy. Odchylenie standardowe poziomu białka w 72 godzinie symulacji w tym układzie jest również bardzo duże (Tabela 5.5). Ponadto można zauważyć, ze wraz ze wzrostem parametru n, wzrasta amplituda oscylacji (Rysunek 5.28A).

5.6.3 Wyniki otrzymane przy zastosowaniu układu z wysokimi wartościami wymuszenia

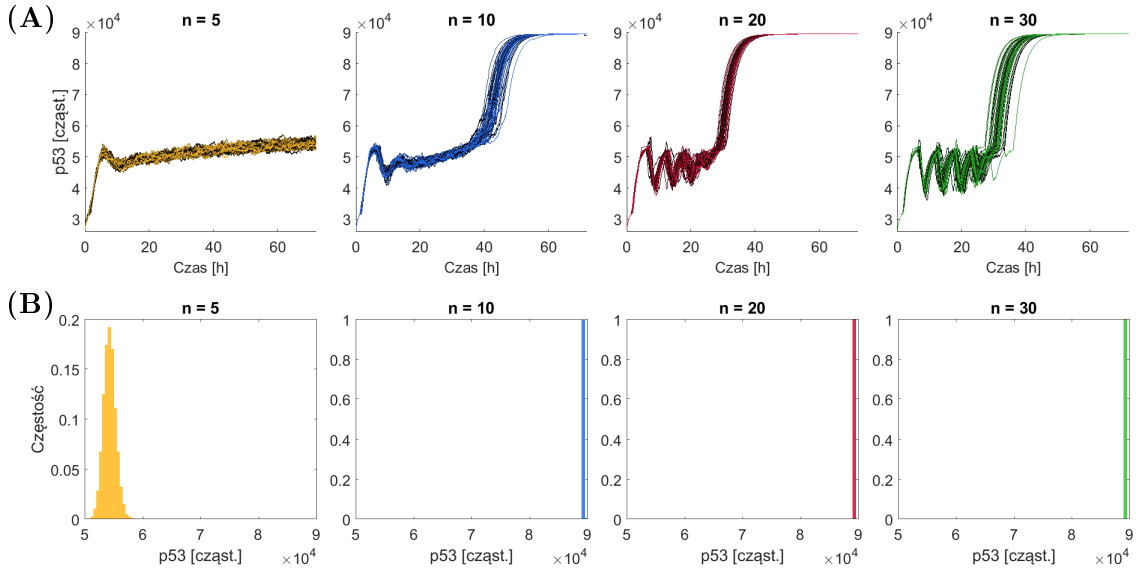
W przypadku modelu stochastyczego, niezależnie od wartości parametru n, pod wpływem dużej dawki wymuszenia ($R = 8\,a.u.$) odpowiedź populacji jest bardzo jednorodna. Porównanie końcowych poziomów białka — średnich i odchyleń standardowych — jest przedstawione w Tabeli 5.6. W modelach o n większym od 5 początkowo występują oscylacje, a następnie jest aktywowana apoptoza. Końcowy poziom białka p53 we wszystkich komórkach jest bardzo podobny (Rysunek 5.29A i B, druga, trzecia i czwarta kolumna).



Rysunek 5.28: Wyniki stochastycznych symulacji modelu białka p53 z wymuszeniem $R = 7.3\,a.u.$; (A) Przebiegi czasowe poziomu białka p53 w układzie dla różnych wartości n (50 przykładowych przebiegów); (B) Histogram liczby cząsteczek białka p53 w 72 godzinie symulacji (5 000 komórek)

Tabela 5.5: Średnie i odchylenia standardowe końcowego poziomu białka p53 w układzie ze średnimi wymuszeniami przy różnych wartościach parametru n

n	5	10	20	30	jednostka
		$R = 5\,a.u.$			
Średnia	41 183	42 398	40 616	40 772	cząst.
Odchylenie standardowe	663	1 021	4 627	4 891	cząst.
		$R = 7.3\,a.u.$			
Średnia	49 318	69 620	89 163	48 721	cząst.
Odchylenie standardowe	818	11 124	595	8 098	cząst.



Rysunek 5.29: Wyniki stochastycznych symulacji układu z wymuszeniem $R = 8\,a.u.$; (A) Przebiegi czasowe poziomu białka p53 w układzie dla różnych wartości n (50 przykładowych przebiegów); (B) Histogram liczby cząsteczek białka p53 w 72 godzinie symulacji (5 000 komórek)

Tabela 5.6: Średnie i odchyleniea standardowe końcowego poziomu białka p53 w układzie z dużym wymuszeniem $R = 9\,a.u.$ dla różnych wartości n

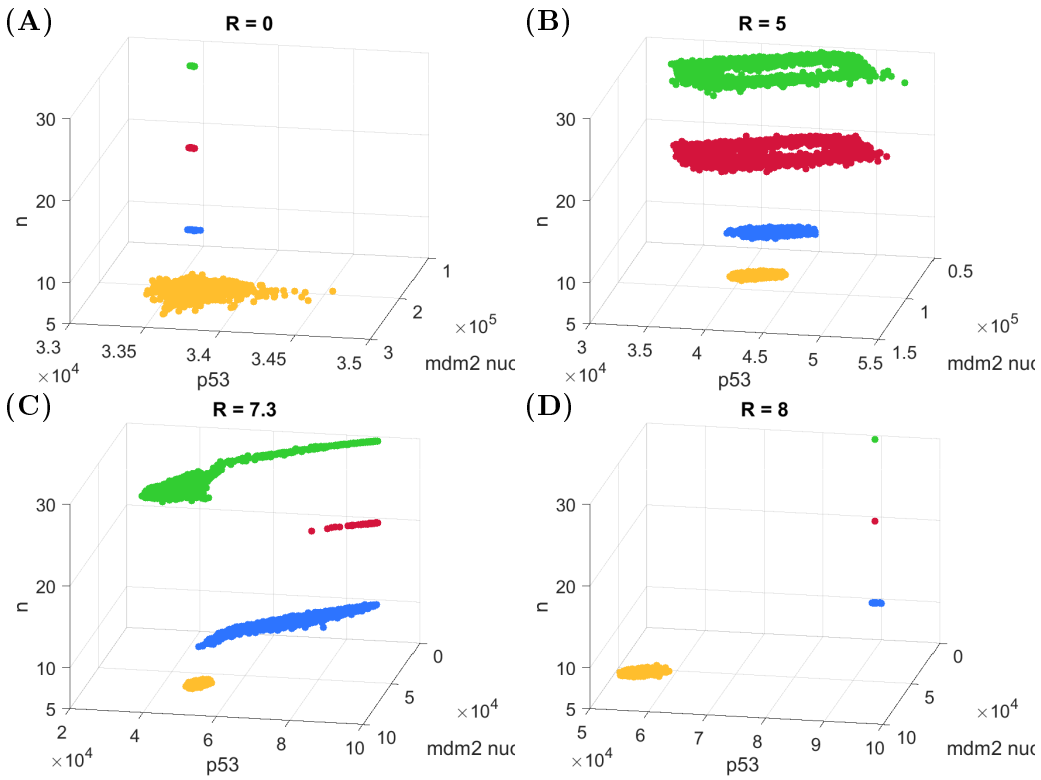
n	5	10	20	30	jednostka
Średnia	54 270	89 435	89 435	89 435	cząst.
Odchylenie standardowe	1 048	40	0	0	cząst.

W przypadku modelu, w którym komórki mają dużą wrażliwość na szeroki zakres liczności cząsteczek regulatorowych odpowiedź ma charakter białego szumu. Poziom białka p53 jest podwyższony, ale w analizowanym horyzoncie czasowym nie jest wystarczający, aby aktywować apoptozę. Z tego powodu, w tym układzie występuje największe odchylenie standardowe (Rysunek 5.29A i B, pierwsza kolumna).

5.6.4 Porównanie wyników

Przy porównaniu poziomów białek p53 oraz jądrowego MDM2 w końcowych chwilach czasu widoczne jest, że tylko w układach z odpowiedzią dążącą do punktu stacjonarnego, spełniona jest intuicyjna zależność między wzrostem wrażliwości na bodźce a zróżnicowaniem odpowiedzi populacji. Dla $R = 0\,a.u.$ oraz $R = 8\,a.u.$ niska wartość n odpowiada największemu zróżnicowaniu odpowiedzi, ponieważ procesy są aktywowane nawet w komórkach o poziomach białka odległych od wartości progowych (Rysunek 5.30A i D). W układzie o niskim wymuszeniu $R = 5\,a.u.$, wraz ze wzrostem n rośnie amplituda oscylacji, a trajektoria poziomu białka jest mniej zaszumiona i ma bardziej regularny, oscylacyjny charakter, widoczny w postaci pierścieni na Rysunku 5.30B. Przy wymuszeniu $R = 7.3\,a.u.$ końcowe wartości poziomów białka tworzą chmury o bardzo nieregularnych kształtach. Dla $n = 5$

chmura jest niewielka i odpowiada średniemu poziomowi p53. Dla $n = 10$ chmura punktów ma podłużny kształt, opisujący zakres wartości od średniego do wysokiego poziomu p53, jaki występuje w populacji komórek aktywujących apoptozę w ciągu kilku ostatnich godzin symulacji. W populacji o $n = 20$ chmura punktów jest skupiona przy wysokich poziomach p53 i niskich MDM2, co odpowiada jednorodnej populacji apoptotycznej. Natomiast dla $n = 30$ duża część komórek to komórki oscylujące przy średnich poziom p53 oraz MDM2, ale jednocześnie widoczny jest ślad, stworzony przez komórki, które podążają do wysokich poziomów p53 (Rysunek 5.30C), co stanowi artefakt metody.



Rysunek 5.30: Liczba cząsteczek białka p53 oraz MDM2 jądrowego w 72 godzinie symulacji, w populacji o różnych wartościach parametru n oraz dla różnych wymuszeń; (A) Wymuszenie $R = 0\,a.u.$; (B) Wymuszenie $R = 5\,a.u.$; (C) Wymuszenie $R = 7.3\,a.u.$; (D) Wymuszenie $R = 8\,a.u.$ (różne kolory odpowiadają różnych wartościom n zgodnie z Rysunkiem 5.25A)

Odpowiedź populacji jest ściśle związana ze specyficznością danej linii komórkowej. Specyficzność tę można scharakteryzować przez parametr n, który opisuje zdolności komórki do aktywacji procesów przy różnych poziomach cząsteczek regulatorowych: niska wartość współczynnika n odpowiada populacji o dużej swobodzie aktywacji procesów regulowanych przez p53, MDM2 i PTEN. Dany proces może zostać aktywowany nawet jeśli liczebność cząsteczek regulatorowych jest bardzo różna od wartości progowej. W przypadku komórek nie poddanych wymuszeniu lub poddanych wysokim wartościom stresu, populacja o dużej swobodzie ma znacznie większe zróżnicowanie obserwowanych odpowiedzi. Dla średniej dawki stresu, średnie wartości n pozwalają na aktywację apoptozy, przy czym czas aktywacji apoptozy jest niższy w komórkach o $n = 20$ niż $n = 10$. Populacja o bardzo wysokim n pozostaje w basenie przyciągania cyklu granicznego i tylko nieliczne komórki aktywują

apoptozę. Przy zwiększaniu wymuszenia następuje coraz większa synchronizacja komórek, w których występują oscylacje, więc czułość na obecność cząsteczek regulatorowych ma mniejsze znacznie.

5.7 Dyskusja

Zastosowanie układów z przełączeniami do modelowania procesów biologicznych jest szczególnie uzasadnione w przypadku układów silnie nieliniowych, w których tempo większości procesów enzymatycznych może być opisane przez krzywe sigmoidalne o różnym stopniu skośności, co pozwala na oddanie dynamiki aktywacji danego procesu. Istnieje wiele modeli białka p53, o bardzo różnym stopniu skomplikowania. Pełne modele, uwzględniające wiele oddziaływań międzyczasteczekowych, są bardzo rozbudowane i zawierają kilkanaście a nawet kilkadziesiąt równań [90, 71, 22], przez co analiza takich modeli jest również nietrywialna. Natomiast uproszczenie modelu prowadzi zazwyczaj do bardzo silnych nieliniowości, które pozwalają zachować odpowiednią dynamikę, jednak ich analiza jest również bardzo trudna i sprowadza się głównie do symulacji numerycznych. Zastosowanie modelowania z przełączeniami pozwala stworzyć proste modele, które można analizować metodami analitycznymi, a które jednocześnie zachowują odpowiednią dynamikę. Oczywiście układy z przełączeniami mają pewne ograniczenia, jednak porównując ich przebiegi czasowe z układem silnie nieliniowym okazuje się, że podstawowa dynamika układu jest zachowana (Rysunek 5.5). Zaletą układów z przełączeniami jest możliwość zastosowania rozbudowanej analizy układu tego typu, co pozwala na lepsze poznanie właściwości analizowanego systemu biologicznego.

W stworzonym modelu modułu regulatorowego białka p53 zaproponowana metodologia pozwoliła na wyznaczenie rozwiązań analitycznych dla podukładów systemu, zlokalizowanie punktów stacjonarnych oraz określenie występowania cykli granicznych. Punkty stacjonarne — zwyczajne oraz osobliwe— charakteryzują zachowanie układu biologicznego i odpowiadają różnym typom odpowiedzi komórek obserwowanym w badaniach eksperymentalnych. W komórce bez zewnętrznego wymuszenia występuje niski poziom p53 oraz wysoki MDM2. Poziomy takie korespondują ze zwyczajnym punktem stacjonarnym w domenie $\{020\}$. Pod wpływem wymuszenia, np. promieniowania jonizującego, DNA w komórce ulega uszkodzeniu i aktywowane są procesy degradacji MDM2. W efekcie obserwuje się zależny od dawki wzrost poziomu p53 komórce. W przypadku niskich dawek średni poziom białka jest podwyższony, a w przebiegach czasowych można zauważyć oscylacje [82]. Takie zachowanie systemu koreluje z obecnością osobliwych punktów stacjonarnych na przecięciu się wartości progowej θ_P oraz θ_{N2}. Osobliwe punkty stacjonarne nie są asymptotycznie stabilne, a pomiędzy domenami dookoła nich znajduje się cykl graniczny zapewniający występowanie niegasnących oscylacji poziomu białka p53 i MDM2. Przekładając to na biologiczne obserwacje, taka odpowiedź układu odpowiada blokadzie cyklu komórkowego i próbie naprawy uszkodzeń materiału genetycznego. Jednocześnie w modelu matematycznym dla średnich i wysokich wartości wymuszenia występuje zwyczajny punkt stacjonarny, w którym poziom białka p53 jest znacznie podniesiony (domena $\{101\}$). Odpowiada on stanowi układu biologicznego, w którym poziom białka p53 jest stale utrzymywany na wysokim poziomie. Stan taki jest możliwy po wyłączeniu pętli sprzężenia ujemnego poprzez akumulację białka PTEN i blokadę transportu MDM2 do jądra. Utrzymanie wysokiego poziomu białka p53 przez dłuższy czas pozwala na akumulację białek odpowiedzialnych za

apoptozę, dzięki czemu komórka ze znacznymi uszkodzeniami jest usuwana z populacji [86]. Na podstawie występowania różnych typów punktów stacjonarnych można przewidywać różną odpowiedź układu w zależności od początkowego stanu komórki. Oczywiście niektóre warunki początkowe nie są biologicznie uzasadnione w prawidłowo funkcjonujących komórkach. Jednak losowość procesów lub nieprawidłowości w procesach wewnątrzkomórkowych mogą skutkować nietypowym zachowaniem, takim jak stabilizacja poziomu białka p53 na średniej wartości odpowiadająca wyznaczonemu analitycznie punktowi stacjonarnemu w domenie $\{111\}$ (sekcja 5.4.2).

Jednocześnie, jak pokazałam na stworzonym modelu modułu regulatorowego białka p53, wyznaczenie punktów stacjonarnych nie jest wystarczające, aby przewidzieć zachowanie układu. Brak analizy basenów przyciągania wokół danego punktu równowagi może skutkować fałszywym określeniem występowania oscylacji, wokół osobliwego punktu stacjonarnego. Teoretyczna trajektoria wokół punktu SSP może przebiegać przez wartość graniczną, co będzie skutkowało zmianą podsystemu i, najprawdopodobniej, zmianą punktu przyciągania. Zatem nawet w układach posiadających punkty SSP, występowanie oscylacji nie jest przesądzone.

Środowisko i charakter procesów biologicznych są tak niejednorodne, że zawężenie badań wyłącznie do analizy oraz symulacji modeli deterministycznych wydaje się sporym ograniczeniem. Już samo uwzględnienie zróżnicowania populacji komórkowej poprzez zróżnicowanie lokalizacji progów aktywacji danych procesów, pozwala na dokładniejszą analizę badanego systemu oraz odniesienie wyników do literaturowych wyników eksperymentów biologicznych. Wartości progowe w modelu odzwierciedlają warunki panujące w komórce, takie jak temperatura, odczyn pH czy stężenie cząsteczek, które wpływają na proces aktywacji i dezaktywacji różnych reakcji enzymatycznych w komórce. Stochastyczna lokalizacja progów umożliwia zamodelowanie różnorodności w populacji obserwowanej w eksperymentach biologicznych.

Metody eksperymentalne pozwalają na badanie poziomów białek w pojedynczych komórkach i na ich podstawie wnioskuje się o powiązaniu różnic w poziomach białek z różnymi odpowiedziami komórek w danej populacji. X. Chen i in. [89] na podstawie przebiegów czasowych w populacji komórkowej wydzielili 4 różne grupy komórek: komórki aktywujące blokadę cyklu komórkowego (oscylujące lub o monotonicznym wzroście poziomu białka p53) oraz komórki apoptotyczne (również oscylujące lub o stałym wzroście poziomu p53). W zaproponowanym powyżej podejściu do modelowania zróżnicowania populacji komórkowej poprzez zmianę lokalizacji progów aktywacji procesów indukowanych przez białka, również obserwuje się zróżnicowanie populacji potraktowanej daną dawką stresu na komórki niereagujące, oscylujące, indukujące niski lub wysoki wzrost poziomu p53, co następnie pozwala wnioskować o podjętej decyzji, co do losu danej komórki. Podobnie jak wyniki eksperymentalne, symulacje wykazały, że główny typ odpowiedzi u komórek apoptotycznych to monotoniczny wzrost, a u komórek aktywujących blokadę cyklu to oscylacje, jednak przewidują również możliwość wystąpienia nietypowego zachowania komórek.

Jak niezwykle ważne jest prawidłowe funkcjonowanie białka p53, pokazują wyniki badania wpływu progu aktywacji ekspresji genów zależnych od p53 na odpowiedzi komórek. W komórkach nowotworowych białko p53 jest często zmutowane, przez co jego aktywność jest nieprawidłowa. Zarówno obniżenie, jak i podwyższenie wartości progu białka p53, przy której następuje indukowana aktywacja ekspresji genów przez białko p53 skutkuje upośledzeniem funkcjonalności modułu regulatorowego oraz innych białek zależnych od niego transkrypcyjnie. W przypadku zbyt niskiego progu, aktywacja produkcji białek zależnych

od p53 zachodzi nawet przy jego niewielkiej ilości. W efekcie pętla sprzężenia ujemnego jest nieaktywna, ponieważ produkcja PTEN skutecznie ją blokuje, poprzez ograniczenie transportu MDM2 do jądra. Symulacje wykazały, że komórki z białkiem p53 o zbyt dużej aktywności, nie mają możliwości aktywowania prawidłowej odpowiedzi na stres. Znane są typy mutacji białka p53, które skutkują nabyciem dodatkowych funkcji (ang. *gain of function*) i skutkują zwiększeniem odporności komórki na sygnały proapoptotyczne [91]. Oczywiście mutacje p53 związane ze zwiększeniem jego funkcjonalności mają bardzo skomplikowany wpływ na różnorodne oddziaływania wewnątrzkomórkowe i nie można ich bezpośrednio przenosić na obserwowany tutaj wpływ przesunięcia progu, niemniej jednak ogólna zależność jest taka sama.

Znacznie lepiej zbadanym zjawiskiem jest występowanie mutacji białka p53, powodującej utratę lub ograniczenie jego funkcjonalności. Badania eksperymentalne wykazują dominujące działanie zmutowanego białka p53 względem prawidłowego białka p53. W komórkach zawierających oba typy białka (jeden allel genu jest poprawny a jeden zmutowany), zmutowane białko znacząco obniża zdolność prawidłowego białka do wiązania się do DNA, przez co zmniejsza zdolność komórki do aktywacji odpowiedzi na stres, poprzez produkcję odpowiednich białek [92]. Występowanie zmutowanego białka w komórce zmniejsza zdolność komórki do nagromadzenia funkcjonalnego białka p53, w stopniu umożliwiającym aktywację ekspresji genów. W przypadku modelu kawałkami liniowym zjawisko to jest modelowane poprzez podniesienie wartości progowej θ_P. Przy niskich dawkach stresu w takiej komórce nie występują oscylacje, a poziom białka p53 stabilizuje się na poziomie podwyższonym względem komórek o standardowym położeniu progu θ_P. Podwyższenie poziomu białka p53 występuje również w komórkach nowotworowych, takich jak linia komórkowa ESCC [93], gdzie wykazano, że wysoki poziom białka p53 koreluje z niskim współczynnikiem przeżywalności pacjentów. Podwyższony poziom białka p53 wykazano również w komórkach nowotworowych piersi i żołądka [94, 95]. Brak oscylacji jest niepożądanym efektem ze względu na brak możliwości powrotu do stanu normalnego w komórce. Ze względu na brak zmiennej oznaczającej poziom uszkodzeń DNA w modelu, a co za tym idzie pominięciem modelowania procesów jego naprawy, występujące oscylacje są niegasnące. W rzeczywistych układach czas występowania oscylacji jest czasem na podjęcie decyzji: jeśli uszkodzenia mogą być skutecznie naprawione, poziom ich spada, a oscylacje stopniowo zanikają do momentu, aż układ powróci do stanu natywnego. Natomiast w przypadku znacznych uszkodzeń, których komórka nie jest w stanie efektywnie naprawić, oscylacje prowadzą do nagromadzenia białka PTEN, aktywacji sprzężenia dodatniego i ostatecznie apoptozy. Przy dużych wartościach θ_P komórki, nawet przy wysokim poziomie uszkodzeń DNA, nie mają możliwości nagromadzenia wystarczającej ilości białka PTEN, aby zablokować transport MDM2 do jądra. W efekcie nawet duże wymuszenie nie wywołuje apoptozy w komórkach, a jedynie blokuje podziały komórkowe. Znaczenie prawidłowego funkcjonowania pętli sprzężenia dodatniego zostało również wykazane w symulacjach ze zrandomizowanym położeniem progu dla aktywacji blokady transportu MDM2 do jądra. Wyniki pokazują, że wraz ze wzrostem wartości θ_T spada zdolność do aktywacji apoptozy. Konieczność akumulacji dużej ilości białka PTEN, uniemożliwia blokadę transportu białka MDM2, przez co zachodzi szybka degradacja p53 a jego poziom nie może wzrosnąć do wysokich wartości. Faktem jest, że w wielu nowotworach, np. prostaty, piersi czy mózgu [96], obserwuje się uszkodzenia w pętli sprzężenia dodatniego, przez co aktywacja apoptozy jest w nich utrudniona lub niemożliwa [97].

Kolejnym ważnym procesem pozwalającym na utrzymanie odpowiedniego poziomu

białka p53 jest proces degradacji białka p53. Degradacja p53 jest ściśle regulowana przez MDM2, a wraz ze wzrostem zdolności MDM2 do aktywacji degradacji p53, spada zdolność komórki do aktywacji apoptozy. W komórkach, w których degradacja p53 jest bardzo łatwo aktywowana, nagromadzenie białka jest utrudnione, a nawet niemożliwe. W komórkach takich nie obserwujemy apoptozy, nawet przy bardzo dużych uszkodzeniach materiału genetycznego. Duża ilość badań biologicznych potwierdza znaczenie MDM2 jako kluczowego, ujemnego regulatora poziomu p53. Zatem rozluźnienie zależności między p53 a MDM2 może stabilizować poziom p53 i aktywować ścieżki przez nie regulowane, prowadząc do blokady podziałów komórkowych i apoptozy. Badania na komórkach nowotworowych pokazują, że zmniejszenie wrażliwości białka p53 na obecność MDM2 pozwala na jego akumulację w jądrze, aktywację genów zależnych od p53 i w efekcie procesów, takich jak blokada cyklu i śmierć komórki [75].

Innym skutkiem zróżnicowania populacji jest desynchronizacja odpowiedzi komórkowej. Badania biologiczne prowadzi się często na częściowo zsynchronizowanej populacji tak, aby wpływ stresu na wszystkie komórki był porównywalny. Komórki będące w różnym stanie oraz w różnych fazach cyklu komórkowego mają różną wrażliwość na czynniki zewnętrzne. Promieniowanie, jak i inne rodzaje stresu, wywołują różną odpowiedź komórki w zależności od fazy cyklu komórkowego [98]. Badania laboratoryjne pokazują, że komórki pomimo zbliżonych warunków początkowych, po pewnym czasie desynchronizują się. Również w organizmach żywych, komórki są zdesynchronizowane. Takie zjawisko jest obserwowane również w wynikach symulacyjnych, gdzie różna zdolność komórki do aktywowania procesów skutkuje zarówno różnym okresem oscylacji jak i przesunięciem czasowym momentu podjęcia decyzji apoptotycznej. W rzeczywistej populacji zróżnicowanie czasu aktywacji apoptozy może być rzędu kilku dni.

Ze względu na losowość aktywacji procesu, wrażliwość komórek na czynniki regulatorowe ma znaczący wpływ na zachowanie populacji. W populacji komórkowej o małym zakresie wrażliwości na białka pełniące rolę enzymów, konieczne jest, aby ich stężenie było bliskie wartości progowej, żeby dana reakcja mogła być aktywowana. Przy niższych stężeniach enzymu, aktywacja procesu jest bardzo mało prawdopodobna, a jednocześnie przy stężeniach wyższych od wartości progowej prawdopodobieństwo dezaktywacji jest bardzo niewielkie. W większości przypadków aktywacja zachodzi w komórce posiadającej stężenie enzymu bliskie wartości progowej, dlatego komórki takie wykazują odpowiedź zbliżoną do odpowiedzi deterministycznych, nie uwzględniających losowości procesów. Zależność wartości funkcji prawdopodobieństwa aktywacji procesu od liczności czynnika regulatorowego została przedstawiona na Rysunku 5.25B. W zależności od wrażliwości pojedynczych komórek oraz od wymuszenia obserwuje się bardzo duże zróżnicowanie odpowiedzi w populacji. Zmianom ulega zarówno typ aktywowanej odpowiedzi, okres w komórkach o oscylujących poziomach, jak i czas podjęcia decyzji apoptotycznej (Rysunki 5.27, 5.28 oraz 5.29). W komórce o dużej wrażliwości na nawet niewielkie stężenia białek, prawdopodobieństwo aktywacji procesu nie jest sztywno związane z poziomem enzymu. W przebiegach czasowych pojawiają się nieregularne oscylacje o charakterze białego szumu (Rysunki 5.26, 5.27, 5.28 oraz 5.29 – pierwsza kolumna). Również podjęcie decyzji apoptotycznej jest utrudnione ze względu na małe przyciąganie przez punkt stacjonarny RSP, przez co układ ślizga się na wartościach progowych. Wraz ze wzrostem zakresu wrażliwości na czynniki regulatorowe w populacji obserwuje się wydłużenie czasu potrzebnego na podjęcie decyzji apoptotycznej po zadziałaniu dużą dawką stresu (Rysunek 5.29 czwarta kolumna). Jednocześnie ze względu na dużą regularność, układy o małym zakresie wrażliwości są mniej skłonne do

aktywacji apoptozy w przypadku dawek stresu poniżej efektywnej dawki wyznaczonej deterministycznie (Rysunek 5.28 czwarta kolumna). Wyniki te podkreślają znaczenie badań stochastycznych jako uzupełnienie analizy deterministycznej układu. Uwzględnienie losowości aktywacji procesu wprowadza pełniejszy obraz zachowania populacji, zarówno przesunięcie w czasie aktywacji decyzji apoptotycznej, jak i zróżnicowanie osiągalnych zakresów poziomu białek.

Rozdział 6

Podsumowanie

W modelach układów biologicznych przełączenia mogą wynikać z wewnętrznej struktury systemu (np. zmiany stanu genu, aktywacji procesu enzymatycznego) lub zewnętrznych oddziaływań. Podział systemu na podukłady ułatwia badanie jego właściwości, ponieważ pozwala na wydzielenie funkcjonalnych części, charakteryzujących układ w pewnym stanie, np. przed i po podaniu leku, przy aktywnej produkcji danego białka lub przy blokadzie jednego z procesów. Ponadto dzięki zastosowaniu modeli liniowych do opisu dynamiki wewnątrz podukładu, możliwe jest zastosowanie szeregu metod do opisu i analizy zachowania układu.

Przedstawiona praca doktorska porządkuje i rozszerza metodykę modelowania i analizy systemów biologicznych przy wykorzystaniu układów kawałkami liniowych. Przy wykorzystaniu metod znanych z literatury oraz autorskich rozwiązań zaproponowałam kompleksowy schemat analizy układów biologicznych. Metodologia ta pozwala na zobrazowanie jakościowego zachowania (przy wykorzystaniu grafów tranzycji), analityczne określenie możliwych odpowiedzi układu (wyznaczając punkty stacjonarne: osobliwe i zwyczajne), zbadanie wpływu zróżnicowania wrażliwości układu na rodzaj aktywowanej odpowiedzi, a także przestudiowanie wpływu losowości przełączenia na typ oraz dynamikę odpowiedzi.

Dzięki wykonanym badaniom wykazałam prawdziwość postawionych tez. W stworzonych modelach produkcji białka oraz modułu regulatorowego białka p53, w wyniku losowej lokalizacji wartości progowych, nastąpiło zróżnicowanie przebiegów czasowych oraz końcowych poziomów białka. W zależności od sprzężenia występującego w układzie, występuje różny zakres końcowych poziomów białka oraz różna skuteczność proponowanej terapii. W przypadku części populacji nie osiągnięto celu terapeutycznego.

Do badanych modeli wprowadziłam losowość przełączeń pomiędzy podsystemami, co pozwoliło odzwierciedlić losowość procesów takich jak aktywacja genów czy procesów enzymatycznych. W efekcie uzyskałam populację komórek o zróżnicowanych przebiegach czasowych, odpowiadającym obserwowanej biologicznie zmienności wewnątrzpopulacyjnej. Przykładem takiej zmienności może być podział populacji na dwie subpopulacje.

Zaproponowana metodologia, dzięki wprowadzeniu różnego stopnia losowości przełączeń, pozwoliła również zbadać wpływ stopnia zależności aktywacji procesu od poziomu czynników regulatorowych. Wraz ze wzrostem losowości zaobserwowałam wzrost desynchronizacji oscylacji w czasie oraz zmniejszenie ich amplitudy, przy jednoczesnym zwiększeniu zaszumienia przebiegów czasowych. Na przykładzie modelu szlaku białka p53 wykazałam, że losowość przełączeń wpływa również na zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej, w sposób zależny od poziomu stresu.

Przeprowadzone badania mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia procesów zachodzących w komórkach, zarówno zdrowych, jak i patologicznych, a także mogą pomóc przy optymalizacji podczas projektowania eksperymentów biologicznych.

Bibliografia

[1] Jorge Cortes. Discontinuous dynamical systems. *IEEE control Systems*, 28(3), 2008.

[2] Zhendong Sun. *Switched linear systems: control and design*. Springer Science & Business Media, 2006.

[3] P Kluk, P Kogut, A Milewski. Automatycznie sterowany ultradźwiękowy generator mocy. *Elektronika: konstrukcje, technologie, zastosowania*, 52(9):198–201, 2011.

[4] Aleks Gollu, Pravin Varaiya. Hybrid dynamical systems. *Proceedings of the 28th IEEE Conference on Decision and Control*, strony 2708–2712. IEEE, 1989.

[5] Roger W Brockett. Hybrid models for motion control systems. *Essays on Control*, strony 29–53. Springer, 1993.

[6] Allen Back, John Guckenheimer, Mark Myers. A dynamical simulation facility for hybrid systems. *Hybrid systems*, strony 255–267. Springer, 1993.

[7] Pravin Varaiya. Smart cars on smart roads: problems of control. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 38(2):195–207, 1993.

[8] Tomomichi Hagiwara, Mituhiko Araki. Design of a stable state feedback controller based on the multirate sampling of the plant output. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 33:812–819, 1988.

[9] Kevin M Passino, Anthony N Michel, Panos J Antsaklis. Lyapunov stability of a class of discrete event systems. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 39(2):269–279, 1994.

[10] Irene Katzela, Mahmoud Naghshineh. Channel assignment schemes for cellular mobile telecommunication systems: A comprehensive survey. *IEEE personal communications*, 3(3):10–31, 1996.

[11] Andrzej Bartoszewicz, Ron J Patton. Sliding mode control. *International Journal of Adaptive Control and Signal Processing*, 21(8-9):635–637, 2007.

[12] Vadim I Utkin. Sliding mode control design principles and applications to electric drives. *IEEE Transactions on Industrial Electronics*, 40(1):23–36, 1993.

[13] Daniel Liberzon. *Switching in systems and control*. Springer Science & Business Media, 2003.

[14] Magdalena Ochab, Krzysztof Puszynski, Andrzej Swierniak. Influence of parameter perturbations on the reachability of therapeutic target in systems with switchings. *Biomedical Engineering Online*, 16(1):77, 2017.

[15] Magdalena Ochab, Andrzej Swierniak, Krzysztof Puszynski. Analysis of the bifurcation behavior of simple biological production-degradation system with switchings. *Proceedings of the XXIII National Conference on Applications of Mathematics in Biology and Medicine*, strony 131–136, 2017.

[16] Vincent Acary, Hidde De Jong, Bernard Brogliato. Numerical simulation of piecewise-linear models of gene regulatory networks using complementarity systems. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 269:103–119, 2014.

[17] Thomas Mestl, Erik Plahte, Stig W Omholt. A mathematical framework for describing and analysing gene regulatory networks. *Journal of Theoretical Biology*, 176(2):291–300, 1995.

[18] P Waage, CM Guldberg. Forhandlinger: Videnskabs-selskabet i christiana, 1864, 35, 1964.

[19] Zhen Wang, Chris T Bauch, Samit Bhattacharyya, Alberto d'Onofrio, Piero Manfredi, Matjaž Perc, Nicola Perra, Marcel Salathé, Dawei Zhao. Statistical physics of vaccination. *Physics Reports*, 664:1–113, 2016.

[20] Ikram Aloulou, Jean-Frederic Brun, Jacques Mercier. Evaluation of insulin sensitivity and glucose effectiveness during a standardized breakfast test: comparison with the minimal model analysis of an intravenous glucose tolerance test. *Metabolism*, 55(5):676–690, 2006.

[21] Marzena Dołbniak, Andrzej Świerniak. Comparison of simple models of periodic protocols for combined anticancer therapy. *Computational and mathematical methods in medicine*, 2013:1–11, 2013.

[22] Katarzyna Jonak, Monika Kurpas, Katarzyna Szoltysek, Patryk Janus, Agata Abramowicz, Krzysztof Puszynski. A novel mathematical model of atm/p53/nf-κ b pathways points to the importance of the ddr switch-off mechanisms. *BMC systems biology*, 10(1):75, 2016.

[23] Krzysztof Puszyński, Roman Jaksik, Andrzej Świerniak. Regulation of p53 by sirna in radiation treated cells: Simulation studies. *International Journal of Applied Mathematics and Computer Science*, 22(4):1011–1018, 2012.

[24] Andrzej Swierniak, Marek Kimmel, Jarosław Smieja, Krzysztof Puszynski, Krzysztof Psiuk-Maksymowicz. *System engineering approach to planning anticancer therapies*. Springer, 2016.

[25] Małgorzata Kardyńska, Anna Paszek, Jarosław Śmieja, David Spiller, Wiesława Widłak, Michael RH White, Pawel Paszek, Marek Kimmel. Quantitative analysis reveals crosstalk mechanisms of heat shock-induced attenuation of nf-κb signaling at the single cell level. *PLoS computational biology*, 14(4):e1006130, 2018.

[26] Eric L Haseltine, James B Rawlings. Approximate simulation of coupled fast and slow reactions for stochastic chemical kinetics. *The Journal of chemical physics*, 117(15):6959–6969, 2002.

[27] Bruce Alberts, Dennis Bray, Karen Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. *Essential cell biology*. Garland Science, 2013.

[28] Yan Wang, Jing Liu, BO Huang, Yan-Mei Xu, Jing Li, Lin-Feng Huang, Jin Lin, Jing Zhang, Qing-Hua Min, Wei-Ming Yang, i in. Mechanism of alternative splicing and its regulation. *Biomedical reports*, 3(2):152–158, 2015.

[29] Jiang Zhu, Mazhar Adli, James Y Zou, Griet Verstappen, Michael Coyne, Xiaolan Zhang, Timothy Durham, Mohammad Miri, Vikram Deshpande, Philip L De Jager, i in. Genome-wide chromatin state transitions associated with developmental and environmental cues. *Cell*, 152(3):642–654, 2013.

[30] Eldra P Salomon, L Berg, D Martin, C Ville. Biologia. *Warszawa: MULTICO*, 1996.

[31] Leonor Michaelis, Maud Leonora Menten. *Die kinetik der invertinwirkung*. Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg, 2007.

[32] Robert K Murray, Daryl K. Granner, Victor W. Rodwell. *Biochemia Harpera ilustrowana*. McGraw-Hill, 2008.

[33] Archibald Vivian Hill. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.*, 40:4–7, 1910.

[34] Norbert Perrimon, Andrew P McMahon. Negative feedback mechanisms and their roles during pattern formation. *Cell*, 97(1):13–16, 1999.

[35] James E Ferrell Jr. Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Current opinion in cell biology*, 14(2):140–148, 2002.

[36] Sandra L Harris, Arnold J Levine. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 24(17):2899, 2005.

[37] Daniel T Gillespie. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *The Journal of Physical Chemistry*, 81(25):2340–2361, 1977.

[38] Cédric Castrogiovanni, Béranger Waterschoot, Olivier De Backer, Patrick Dumont. Serine 392 phosphorylation modulates p53 mitochondrial translocation and transcription-independent apoptosis. *Cell death and differentiation*, 25(1):190, 2018.

[39] Jean-Luc Gouzé, Tewfik Sari. A class of piecewise linear differential equations arising in biological models. *Dynamical systems*, 17(4):299–316, 2002.

[40] Magdalena Ochab, Monika Kurpas, Wojciech Bensz. *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce,*, wolumen Inzynieria w medycynie, rozdzia/l Modelowanie regulatorowych sieci genowych (GRN) - przegląd metod, strony 36–43. Młodzi Naukowcy, Poznań, 2016.

[41] John J Tyson, Hans G Othmer. The dynamics of feedback control circuits in biochemical pathways. *Prog. Theor. Biol*, 5(1):62, 1978.

[42] El Houssine Snoussi, Rene Thomas. Logical identification of all steady states: the concept of feedback loop characteristic states. *Bulletin of Mathematical Biology*, 55(5):973–991, 1993.

[43] Thomas Mestl, Erik Plahte, Stig W Omholt. Periodic solutions in systems of piecewise-linear differential equations. *Dynamics and stability of systems*, 10(2):179–193, 1995.

[44] Roderick Edwards. Analysis of continuous-time switching networks. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 146(1-4):165–199, 2000.

[45] Erik Plahte, Sissel Kjøglum. Analysis and generic properties of gene regulatory networks with graded response functions. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 201(1-2):150–176, 2005.

[46] Erik Plahte, Thomas Mestl, Stig W Omholt. A methodological basis for description and analysis of systems with complex switch-like interactions. *Journal of mathematical biology*, 36(4):321–348, 1998.

[47] Hidde De Jong. Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review. *Journal of computational biology*, 9(1):67–103, 2002.

[48] Benjamin Kuipers. Qualitative simulation. *Artificial intelligence*, 29(3):289–338, 1986.

[49] Karsten R. Heidtke, Steffen Schulze-Kremer. Design and implementation of a qualitative simulation model of lambda phage infection. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 14(1):81–91, 1998.

[50] Hidde De Jong, Jean-Luc Gouzé, Céline Hernandez, Michel Page, Tewfik Sari, Johannes Geiselmann. Qualitative simulation of genetic regulatory networks using piecewise-linear models. *Bulletin of mathematical biology*, 66(2):301–340, 2004.

[51] Hidde De Jong, Johannes Geiselmann, Céline Hernandez, Michel Page. Genetic network analyzer: qualitative simulation of genetic regulatory networks. *Bioinformatics*, 19(3):336–344, 2003.

[52] Mark HA Davis. Piecewise-deterministic markov processes: A general class of non-diffusion stochastic models. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 46(3):353–376, 1984.

[53] Ryszard Rudnicki, Marta Tyran-Kamińska. Piecewise deterministic markov processes in biological models. Jacek Banasiak, Adam Bobrowski, Mirosław Lachowicz, redaktorzy, *Semigroups of Operators -Theory and Applications*, strony 235–255, Cham, 2015. Springer International Publishing.

[54] Hans G Othmer, Steven R Dunbar, Wolfgang Alt. Models of dispersal in biological systems. *Journal of mathematical biology*, 26(3):263–298, 1988.

[55] Ryszard Rudnicki, Marta Tyran-Kamińska. *Piecewise deterministic processes in biological models*, wolumen 1. Springer, 2017.

[56] Andrea Bacciotti, Francesca Ceragioli. Stability and stabilization of discontinuous systems and nonsmooth lyapunov functions. *ESAIM: Control, Optimisation and Calculus of Variations*, 4:361–376, 1999.

[57] Eduardo D Sontag. Stability and stabilization: discontinuities and the effect of disturbances. *Nonlinear analysis, differential equations and control*, strony 551–598. Springer, 1999.

[58] Daniel Liberzon, A Stephen Morse. Basic problems in stability and design of switched systems. *IEEE Control systems*, 19(5):59–70, 1999.

[59] Daniel Liberzon, Joao P Hespanha, A Stephen Morse. Stability of switched systems: a lie-algebraic condition. *Systems & Control Letters*, 37(3):117–122, 1999.

[60] Lih-Hsing Hsu, Cheng-Kuan Lin. *Graph theory and interconnection networks*. CRC press, 2008.

[61] Stig W Omholt, Erik Plahte, Leiv Øyehaug, Kefang Xiang. Gene regulatory networks generating the phenomena of additivity, dominance and epistasis. *Genetics*, 155(2):969–980, 2000.

[62] Erik Plahte, Thomas Mestl, Stig W Omholt. Global analysis of steady points for systems of differential equations with sigmoid interactions. *Dynamics and Stability of Systems*, 9(4):275–291, 1994.

[63] Richard Casey, Hidde De Jong, Jean-Luc Gouzé. Piecewise-linear models of genetic regulatory networks: equilibria and their stability. *Journal of mathematical biology*, 52(1):27–56, 2006.

[64] Wilfrid Perruquetti, Jean Pierre Barbot. *Sliding mode control in engineering*, wolumen 11. M. Dekker, 2002.

[65] Arie Levant. Sliding order and sliding accuracy in sliding mode control. *International Journal of Control*, 58(6):1247–1263, 1993.

[66] WŁADYSŁAW Jakubiec, WOJCIECH Płowucha, P Rosner. „szacowanie niepewności pomiaru w budowie maszyn. budżet niepewności". *Mechanik*, 12:1802–1805, 2016.

[67] Francis HC Crick. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol*, wolumen 12, strona 8, 1958.

[68] Krzysztof Puszynski, Alberto Gandolfi, Alberto d'Onofrio. The pharmacodynamics of the p53-mdm2 targeting drug nutlin: the role of gene-switching noise. *PLoS computational biology*, 10(12):e1003991, 2014.

[69] Robert J Johnston Jr, Sarah Chang, John F Etchberger, Christopher O Ortiz, Oliver Hobert. Microrna acting in a double-negative feedback loop to control a neuronal cell fate decision. *PNAS*, 102(35):12449–12454, 2005.

[70] Wen Xiong, James E Ferrell Jr. A positive-feedback-based bistable 'memory module'that governs a cell fate decision. *Nature*, 426(6965):460, 2003.

[71] Krzysztof Puszyński, Beata Hat, Tomasz Lipniacki. Oscillations and bistability in the stochastic model of p53 regulation. *Journal of Theoretical Biology*, 254(2):452–465, 2008.

[72] Karen H Vousden, Xin Lu. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer*, 2(8):594–604, 2002.

[73] Jack T. Zilfou, Scott W. Lowe. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 00:a001883:1–13, 2009.

[74] Naama Geva-Zatorsky, Nitzan Rosenfeld, Shalev Itzkovitz, Ron Milo, Alex Sigal, Erez Dekel, Talia Yarnitzky, Yuvalal Liron, Paz Polak, Galit Lahav, i in. Oscillations and variability in the p53 system. *Molecular systems biology*, 2(1):2006.0033, 2006.

[75] Lyubomir T. Vassilev. Mdm2 inhibitors for cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 13(1):23 – 31, 2007.

[76] Eric Batchelor, Alexander Loewer, Caroline Mock, Galit Lahav. Stimulus-dependent dynamics of p53 in single cells. *Molecular Systems Biology*, 7(1):488, 2011.

[77] Magdalena Ochab, Monika Kurpas, Wojciech Bensz. *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce,*, wolumen Inzynieria w medycynie, rozdzia/l Systemy biologiczne jako układy z przełączeniami na przykładzie modułu regulatorowego p53, strony 44–52. Młodzi Naukowcy, Poznań, 2016.

[78] Magdalena Ochab, Krzysztof Puszynski, Andrzej Swierniak. Application of the piecewise linear models for description of nonlinear biological systems based on p53 regulatory unit. *Proceedings of the XII National Conference on Applications of mathematics in biology and medicine*, strony 85–90, 2016.

[79] Magdalena Ochab, Krzysztof Puszynski, Andrzej Swierniak, Jerzy Klamka. Variety behavior in the piece-wise linear model of the p53-regulatory module. *Proceedings of the International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, strony 208–219. Springer, 2017.

[80] Magdalena Ochab, Andrzej Swierniak, Jerzy Klamka, Krzysztof Puszynski. Apoptotic regulatory module as switched control system - analysis of asymptotic properties. *Proceedings of the 9th International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms*, strony 119–126, 01 2018.

[81] Magdalena Ochab, Andrzej Swierniak, Jerzy Klamka, Krzysztof Puszynski. Influence of the stochasticity in threshold localization on cell fate in the plde-model of the p53 module. *Proceedings of the Polish Conference on Biocybernetics and Biomedical Engineering*, strony 205–217. Springer, 2017.

[82] Ruth Lev Bar-Or, Ruth Maya, Lee A Segel, Uri Alon, Arnold J Levine, Moshe Oren. Generation of oscillations by the p53-mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21):11250–11255, 2000.

[83] Natasha D Marchenko, Sonja Wolff, Susan Erster, Kerstin Becker, Ute M Moll. Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation. *The EMBO journal*, 26(4):923–934, 2007.

[84] Santosh K Katiyar, Anshu M Roy, Manjeshwar S Baliga. Silymarin induces apoptosis primarily through a p53-dependent pathway involving bcl-2/bax, cytochrome c release, and caspase activation. *Molecular cancer therapeutics*, 4(2):207–216, 2005.

[85] Galit Lahav, Nitzan Rosenfeld, Alex Sigal, Naama Geva-Zatorsky, Arnold J Levine, Michael B Elowitz, Uri Alon. Dynamics of the p53-mdm2 feedback loop in individual cells. *Nature genetics*, 36(2):147, 2004.

[86] M Kracikova, G Akiri, A George, R Sachidanandam, SA Aaronson. A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis. *Cell death and differentiation*, 20(4):576, 2013.

[87] Nancy L Lill, Steven R Grossman, Doron Ginsberg, James DeCaprio, David M Livingston. Binding and modulation of p53 by p300/cbp coactivators. *Nature*, 387(6635):823, 1997.

[88] Lindsey D Mayo, David B Donner. The pten, mdm2, p53 tumor suppressor–oncoprotein network. *Trends in biochemical sciences*, 27(9):462–467, 2002.

[89] Xi Chen, Jia Chen, Siting Gan, Huaji Guan, Yuan Zhou, Qi Ouyang, Jue Shi. Dna damage strength modulates a bimodal switch of p53 dynamics for cell-fate control. *BMC biology*, 11(1):73, 2013.

[90] Bing Liu, Divesh Bhatt, Zoltán N Oltvai, Joel S Greenberger, Ivet Bahar. Significance of p53 dynamics in regulating apoptosis in response to ionizing radiation, and polypharmacological strategies. *Scientific reports*, 4:6245, 2014.

[91] Moshe Oren, Varda Rotter. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(2):a001107, 2010.

[92] Amy Willis, Eun Joo Jung, Therese Wakefield, Xinbin Chen. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene*, 23(13):2330, 2004.

[93] Kate Huang, Lin Chen, Jiliang Zhang, Zhi Wu, Linhua Lan, Lu Wang, Bin Lu, Yongzhang Liu. Elevated p53 expression levels correlate with tumor progression and poor prognosis in patients exhibiting esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology letters*, 8(4):1441–1446, 2014.

[94] Ann D Thor, Dan H Moore, Susan M Edgerton, Ernest S Kawasaki, Ellen Reihsaus, Henry T Lynch, Joseph N Marcus, Laurent Schwartz, Ling-Chun Chen, Brian H Mayall, i in. Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 84(11):845–855, 1992.

[95] Cai-De Lu, Dario C Altieri, Nobuhiko Tanigawa. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer research*, 58(9):1808–1812, 1998.

[96] Jing Li, Clifford Yen, Danny Liaw, Katrina Podsypanina, Shikha Bose, Steven I Wang, Janusz Puc, Christa Miliaresis, Linda Rodgers, Richard McCombie, i in. Pten, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *science*, 275(5308):1943–1947, 1997.

[97] Nick R. Leslie, Jeroen den Hertog. Mutant pten in cancer: Worse than nothing. *Cell*, 157(3):527 – 529, 2014.

[98] Timothy M Pawlik, Khandan Keyomarsi. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 59(4):928–942, 2004.

Spis rysunków

2.1 Sygnał przełączający (σ) w układzie z przełączeniami zależnymi od czasu . 19
2.2 Przestrzeń stanu w układach z przełączeniami zależnymi od stanu układu . 19
2.3 Tempo reakcji (v) w zależności od liczby cząsteczek substratu (S) 25
2.4 Schemat przykładowego systemu z ujemnym sprzężeniem zwrotnym 26
2.5 Porównanie wyników modelu sieci dwóch białek: nieliniowego i z przełączeniami 30
2.6 Porównanie wyników modelu dwóch białek: nieliniowego (czerwony) i z przełączeniami (niebieski) po podaniu leku 31

3.1 Graf tranzycji między domenami dla prostego układu 42
3.2 Porównanie logoidy i funkcji skokowej 43
3.3 Przestrzeń stanu układu z wartościami progowym θ_1 i θ_2 44
3.4 (A) Przestrzeń stanu z cyklem i punktem stacjonarnym zlokalizowanym na przecięciu wartości progowych; (B) Przestrzeń stanu układu dwóch zmiennych z dwiema wartościami progowymi 47
3.5 Algorytm znajdowania punktów SSP w układzie PLDE 52
3.6 Przebieg trajektorii w układzie ze stabilnym punktem SSP pierwszego wymiaru 53
3.7 Odpowiedź przykładowego układu z punktem SSP typu centrum 54
3.8 Odpowiedź przykładowego układu z punktem SSP typu siodło 56
3.9 Algorytm symulacji populacji heterogenicznej przy wykorzystaniu układów PLDE 59
3.10 Prawdopodobieństwo aktywacji reakcji przy różnych wartościach parametru Hilla 62
3.11 Algorytm symulacji populacji z losową aktywacji procesów 63
3.12 Schemat analizy układów z przełączeniami 64

4.1 Model produkcji białka 68
4.2 Przebiegi czasowe poziomu białka po podaniu dawki krytycznej 71
4.3 Graf tranzycji dla modeli produkcji białka ze sprzężeniem ujemnym oraz dodatnim w zależności od dawki leku 78
4.4 Wykresy bifurkacyjne liczby, położenia i rodzajów punktów stacjonarnych w zależności od dawki leku 83
4.5 Odpowiedź układu z sprzężeniem dodatnim na różne dawki leku 84
4.6 Odpowiedź układu z sprzężeniem ujemnym na różne dawki leku 85
4.7 Odpowiedź populacji heterogenicznej (model ze sprzężeniem dodatnim) na podanie leku 87

4.8 Odpowiedź populacji heterogenicznej (model ze sprzężeniem ujemnym) na podanie leku . . . 88
4.9 Odpowiedź populacji o zróżnicowanym czasie podania leku . . . 90
4.10 Odpowiedź populacji na zróżnicowanie progu aktywacji genu oraz czasu podania leku . . . 91
4.11 Zależność wartości prawdopodobieństwa w funkcji liczby cząsteczek białka dla różnych wartości współczynnika Hilla n. . . . 92
4.12 Przebiegi czasowe poziomu białka w przykładowych 200 komórkach dla różnych wartości współczynnika n bez podania leku . . . 93
4.13 Końcowy poziom białka w populacji o różnej wrażliwości (parametr n) przy różnych dawkach leku (układ ze sprzężeniem dodatnim). . . . 94
4.14 Histogram końcowego poziomu białka w populacji mało wrażliwej na niski poziom białka ($n = 5$) po podaniu leku w dawce $3.5 \cdot 10^3$ (układ ze sprzężeniem dodatnim). . . . 95
4.15 Zakres zróżnicowania populacji komórkowej o różnej wrażliwości (parametr n) przy różnych dawkach leku (układ ze sprzężeniem dodatnim). . . . 96
4.16 Przebieg poziomu białka w populacji komórek o różnej wrażliwości (parametr n) po podaniu 3 000 cząsteczek leku (układ ze sprzężeniem dodatnim) 96
4.17 Końcowy poziom białka w populacji o różnej wrażliwości (parametr n) przy różnych dawkach leku (układ ze sprzężeniem ujemnym) . . . 97
4.18 Przebieg poziomu białka w populacji komórek o różnych wartościach parametru n po podaniu 7 500 cząsteczek leku (układ ze sprzężeniem ujemnym) 98
4.19 Zakres zróżnicowania populacji komórkowej scharakteryzowanych różnymi wartościami parametru n przy różnych dawkach leku (układ ze sprzężeniem ujemnym). . . . 98

5.1 Struktura modelu modułu regulatorowego białka p53 . . . 105
5.2 Porównanie przebiegów czasowych otrzymanych za pomocą modelu kawałkami liniowego i nieliniowego w systemie bez wymuszenia . . . 108
5.3 Porównanie przebiegów czasowych otrzymanych za pomocą modelu kawałkami liniowego i nieliniowego z wymuszeniem $R = 4\,a.u.$ . . . 109
5.4 Porównanie przebiegów czasowych w modelu kawałkami liniowym i nieliniowym w systemie z wymuszeniem $R = 9\,a.u.$ . . . 110
5.5 Przebiegi czasowe poziomu białka p53 przy różnych wartościach stresu R . . 111
5.6 Graf tranzycji dla modelu z różnymi dawkami wymuszenia . . . 115
5.7 Lokalizacja punktów SSP w przestrzeni stanu wyznaczonych dla modelu białka p53 dla różnych wartości wymuszenia . . . 126
5.8 Wykresy bifurkacyjne poziomów białek w zależności od wymuszenia . . . 127
5.9 Przebiegi czasowe poziomów białek p53, MDM2 jądrowego oraz PTEN dla różnych wymuszeń i różnych punktów startowych; . . . 129
5.10 Przebiegi czasowe poziomu białka p53 przy nominalnym ułożeniu wartości progowych w odpowiedzi w zależności od różnych dawek stresu . . . 131
5.11 Zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej w populacji heterogenicznej pod względem lokalizacji θ_P na różne dawki wymuszenia . . . 132
5.12 Odpowiedź populacji heterogenicznej (SD = 20% θ_P) na wymuszenie $R = 1\,a.u.$ . . . 133

5.13 Odpowiedź populacji heterogenicznej (SD = 20% θ_P) na wymuszenie $R = 5\,a.u.$ . . . 134
5.14 Odpowiedź populacji heterogenicznej (SD = 20% θ_P) na wymuszenie $R = 9\,a.u.$ . . . 135
5.15 Wpływ wartości progowej θ_P na zakres odpowiedzi komórki . . . 137
5.16 Zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej w populacji heterogenicznej pod względem lokalizacji θ_T na różne dawki wymuszenia . . . 138
5.17 Odpowiedź populacji heterogenicznej pod względem aktywacji blokady transportu MDM2 (SD = 20% θ_T) na wymuszenie $R = 9\,a.u.$ . . . 139
5.18 Wpływ wartości progowej θ_T na zakres odpowiedzi komórki . . . 140
5.19 Zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej na różne dawki wymuszenia w populacji heterogenicznej pod względem lokalizacji θ_{N1} . . . 140
5.20 Odpowiedź populacji heterogenicznej pod względem aktywacji degradacji p53 (SD = 20% θ_{N1}) na wymuszenie $R = 1\,a.u.$ . . . 141
5.21 Odpowiedź populacji heterogenicznej pod względem aktywacji degradacji p53 (SD = 20% θ_{N1}) na wymuszenie $R = 9\,a.u.$ . . . 142
5.22 Wpływ wartości progowej θ_{N1} na zakres odpowiedzi komórki . . . 143
5.23 Zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej w populacji heterogenicznej pod względem wszystkich wartości progowych na różne dawki wymuszenia . . . 144
5.24 Odpowiedź populacji heterogenicznej pod względem lokalizacji wszystkich analizowanych progów (SD = 20% θ) na wymuszenie $9\,a.u.$ . . . 145
5.25 (A) Wartość funkcji prawdopodobieństwa dla różnych wartości parametru n dla progu θ_P; (B) Deterministyczna odpowiedź układu na różne wartości wymuszenia . . . 146
5.26 Wyniki stochastycznych symulacji modelu białka p53 bez wymuszenia . . . 148
5.27 Wyniki stochastycznych symulacji modelu białka p53 z wymuszeniem $R = 5\,a.u.$ . . . 149
5.28 Wyniki stochastycznych symulacji modelu białka p53 z wymuszeniem $R = 7.3\,a.u.$ . . . 150
5.29 Wyniki stochastycznych symulacji układu z wymuszeniem $R = 8\,a.u.$ . . . 151
5.30 Liczba cząsteczek białka p53 oraz MDM2 jądrowego w 72 godzinie symulacji, w populacji o różnych wartościach parametru n oraz dla różnych wymuszeń 152

Spis tabel

2.1 Znaczenie i wartości parametrów modelu produkcji białka zależnego od czynników transkrypcyjnych 31

4.1 Znaczenie i wartość parametrów modelu produkcji białka 70

5.1 Wartości początkowe, parametry i progi w modelu PLDE białka p53 107
5.2 Wartości parametrów w nieliniowym modelu białka p53 108
5.3 Wartości poziomów białek w punktach RSP 117
5.4 Średnie i odchylenia standardowe końcowego poziomu białka p53 w układzie bez wymuszenia dla różnych wartości n 147
5.5 Średnie i odchylenia standardowe końcowego poziomu białka p53 w układzie ze średnimi wymuszeniami przy różnych wartościach parametru n 150
5.6 Średnie i odchyleniea standardowe końcowego poziomu białka p53 w układzie z dużym wymuszeniem $R = 9\,a.u.$ dla różnych wartości n 151

Spis osiągnięć autorki

Publikacje

Pełne artykuły opublikowane w czasopismach figurujących na liście filadelfijskiej:

1. Ochab M, Puszynski K, Swierniak A: Influence of parameter perturbations on the reachability of therapeutic target in systems with switchings. Biomedical Engineering Online, 2017, 16(Suppl 1)(77) (Lista A, 25 pkt. MNiSW)

Artykuły opublikowane w recenzowanych materiałach konferencyjnych indeksowanych w Web of Science:

1. Ochab M, Puszynski K, Swierniak A, Klamka J: Variety behavior in the piece-wise linear model of the p53-regulatory module. In: Bioinformatics and Biomedical Engineering. IWBBIO 2017. Lecture Notes in Computer Science, Springer, Cham, 2017, p. 208-219 (15 pkt. MNiSW)

2. Ochab M, Swierniak A, Klamka J, Puszynski K: Influence of the Stochasticity in Threshold Localization on Cell Fate in the PLDE-Model of the P53 Module. In: Recent Developments and Achievements in Biocybernetics and Biomedical Engineering. PCBBE 2017. Advances in Intelligent Systems and Computing, Springer, Cham, 2017, p. 205-217 (15 pkt. MNiSW)

3. Ochab M, Puszynski K, Swierniak A: Structural stability of biological models with switchings. 21^{th} International Conference on Methods and Models in Automation & Robotics, 2016 (15 pkt. MNiSW)

4. Ochab M, Puszynski K, Swierniak A: Reachability of the Therapeutic Target in the Systems with Parameters Switch. Bioinformatics and Biomedical Engineering, 4^{th} International Conference, IWBBIO 2016, Granada, Proceedings, 2016, 9656, p. 573-584 (15 pkt. MNiSW)

5. Bensz W, Borys D, Fujarewicz K, Herok K, Jaksik R, Krasucki M, Kurczyk A, Matusik K, Mrozek D, Ochab M, Pacholczyk M, Pieter J, Puszynski K, Psiuk-Maksymowicz K, Student S, Swierniak A, Smieja J: Integrated system supporting research on environment related cancers. In: Recent Developments in Intelligent Information and Database Systems, Springer, 2016, p. 399-409 (15 pkt. MNiSW)

6. Swierniak A, Ochab M, Smieja J: Sensitivity of switching control systems in the case of fixed terminal state. 20^{th} International Conference on Methods and Models in Automation & Robotics, 2015, p. 325-328 (15 pkt. MNiSW)

Pozostałe artykuły w recenzowanych materiałach konferencyjnych lub monografiach:

1. Ochab M, Swierniak A, Klamka J, Puszynski K: Apoptotic Regulatory Module as Switched Control System - Analysis of Asymptotic Properties. Proceedings of the 11^{th} International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies (BIOSTEC 2018), 2018, 3: Bioinformatics, p. 119-126 (5 pkt. MNiSW)

2. Ochab M, Puszynski K: Zastosowanie dyskretnych modeli wpływu fluktuacji cząsteczek regulatorowych na procesy komórkowe. In: Automatyzacja procesów dyskretnych. Teoria i zastosowania, Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice, 2018, p. 139-146 (5 pkt. MNiSW)

3. Ochab M, Swierniak A, Puszynski K: Analysis of the bifurcation behavior of simple biological production-degradation system with switchings. In: Proceedings of the 23 National Conference on applications of mathematics in biology and medicine, Politechnika Śląska, Gliwice, 2017, p. 131-136 (5 pkt. MNiSW)

4. Ochab M, Puszynski K, Swierniak A: Application of the piece-wise linear models for description of nonlinear biological systems based on p53 regulatory unit. In: Proceedings of the XXI National Conference on Applications of Mathematics in Biology and Medicine, Wydawnictwo Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, Kielce, 2016, p. 85-90 (5 pkt. MNiSW)

5. Kurpas M, Bensz W, Ochab M: Przegląd modeli matematycznych cyklu komórkowego. In: Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Inżynieria w medycynie., Młodzi Naukowcy, Poznań, 2016, p. 64-71 (5 pkt. MNiSW)

6. Kurpas M, Bensz W, Ochab M: Przegląd modeli matematycznych szlaków detekcji uszkodzeń DNA. In: Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Inżynieria w medycynie., Młodzi Naukowcy, Poznań, 2016, p. 72-79(5 pkt. MNiSW)

7. Bensz W, Kurpas M, Ochab M: Wybrane metody uproszczonego modelowania matematycznego procesów wewnątrzkomórkowych. In: Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Inżynieria w medycynie., Młodzi Naukowcy, Poznań, 2016, p. 58-63 (5 pkt. MNiSW)

8. Bensz W, Kurpas M, Ochab M: Modelowanie wybranych skutków ubocznych chemioterapii. In: Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Inżynieria w medycynie., Młodzi Naukowcy, Poznań, 2016, p. 53-57 (5 pkt. MNiSW)

9. Ochab M, Kurpas M, Bensz W: Systemy biologiczne jako układy z przełączeniami na przykładzie modułu regulatorowego p53. In: Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Inżynieria w medycynie., Młodzi Naukowcy, Poznań, 2016, p. 44-53 (5 pkt. MNiSW)

10. Ochab M, Kurpas M, Bensz W: Modelowanie regulatorowych sieci genowych (GRN) - przegląd metod. In: Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Inżynieria w medycynie, Młodzi Naukowcy, Poznań, 2016, p. 36-44 (5 pkt. MNiSW)

11. Ochab M: Wpływ stochastyczności przełączania genów na los komórki. In: Zeszyt Naukowy z II Interdyscyplinarnej Sesji Wyjazdowej Doktorantów Politechniki Śląskiej, Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych, Gliwice, 2015, p. 252-260 (5 pkt. MNiSW)

12. Ochab M, Puszynski K: Wpływ poziomu białka p53 na los komórki. XVIII Krajowa Konferencja Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej, 2013 (5 pkt. MNiSW)

13. Ochab M, Skonieczna M: Sygnalizacja komórkowa w warunkach stresu oksydacyjnego. Podstawy Biotechnologii Środowiskowej - trendy, badania, implementacje, 2013 (5 pkt. MNiSW)

Udział w konferencjach

Wyniki badań autorka prezentowała w formie wystąpień lub posterów na konferencjach:
międzynarodowych

1. Gliwice Scientific Meeting (w latach 2013 - 2018), Gliwice, Polska

2. 2^{nd} Erice International Conference on Mathematical and Computational Epidemiology, Erice (Sycylia), 28.08 – 5.09.2018

3. 11^{th} International Joint Conference on Biomedical Engineering Systems and Technologies (BIOSTEC 2018), Funchal (Madera) 19-21.01.2018

4. International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, Granada, Spain (w latach 2016 i 2017)

5. International Conference on Methods and Models in Automation and Robotics, (2016) Międzyzdroje, Polska

6. 20^{th} Polish Conference on Biocybernetics and Biomedical Engineering, Kraków, Polska, 20-22.09.2017

7. International Conference Cybernetic Modelling of Biological Systems MCSB, Kraków, Polska, 14-15.05.2015

8. 19^{th} Annual International Conference on Research in Computational Molecular Biology, Warszawa, Polska, 12-15.04.2015

oraz krajowych

1. XXI Krajowa Konferencja Automatyzacji Procesów Dyskretnych, Zakopane, Polska, 26-29.09.2018

2. Krajowa Konferencja Zastosowań Matematyki w Biologii i Medycynie, Sandomierz (2016) i Jugowice (2017), Polska

3. Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce – Inżynieria w medycynie, Kwiecień 2016, Wrocław, Polska,

4. XVIII Krajowa Konferencja Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej, Gdańska, Polska, 2013

Nagrody

1. Laureatka konkursu na zwiększenie stypendium doktoranckiego z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych w latach: 2014/2015, 2015/2016, 2016/2017 i 2018/2019.

2. Laureatka konkursu na stypendium dla najlepszych doktorantów w latach: 2014/2015, 2015/2016, 2016/2017, 2017/2018 i 2018/2019.

3. wyróżnienie za prezentację *Analiza układów biologicznych z przełączeniami* zaprezentowaną podczas IIII Ogólnokrajowej Konferencji Naukowej Młodzi Naukowcy w Polsce – Badania i Rozwój w 2016 roku

4. wyróżnienie za poster *Double role of the p53 in the induction of cell response to DNA damages* zaprezentowaną na VIII Gliwice Scientific Meetings w 2014 roku

Projekty

1. **Grant Narodowego Centrum Nauki (UMO-2016/23/B/ST6/03455)**
   Kierownik: dr hab. inż. Krzysztof Puszyński, prof. Pol. Sl.
   Tytuł projektu: Efektywne algorytmy symulacji modeli procesowych stochastycznych w biologii obliczeniowej oraz metody syntezy modeli szlaków sygnałowych
   Czas: 1.01.2018 - 30.6.2020
   Rola: doktorant - stypendysta

2. **Grant Narodowego Centrum Nauki (DEC-2014/13/B/ST7/00755)**
   Kierownik: prof. dr hab. inż. czł. rzecz. PAN Jerzy Klamka
   Tytuł projektu: Analiza własności układów hybrydowych w zastosowaniu do modelowania i sterowania złożonych systemów dynamicznych
   Czas: 1.06.2015 - 30.12.2017
   Rola: doktorant - stypendysta

3. **Grant Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (POIG.02.03.01-00-040/13)**
   Kierownik: dr hab. inż. Jarosław Śmieja, prof. nzw w Pol. Śl.
   Tytuł projektu: Zintegrowany system informatyczny wspomagający badania nad nowotworami pochodzenia środowiskowego. SYSCANCER
   Czas: 2.03.2015 - 30.11.2015
   Rola: asystent

Wyjazdy naukowe

1. Staż naukowy finansowany z programu Erasmus +, International Prevention Research Institute, Lyon (Ecully), France, 12.02.2018 - 12.06.2018, opiekun naukowy: Alberto d'Onofrio, temat stażu: *Application of stochastic modelling in variety of biological systems*

2. Szkoła letnia, 11^{th} q-bio Summer School, Fort Collins, Colorado, USA, 4-10.06.2017; temat kursu: *Cancer Dynamics*