Politechnika Śląska
Wydział Automatyki, Elektroniki i Informatyki

mgr inż. Magdalena Ochab

Zastosowanie metodyki układów z przełączeniami do opisu i analizy układów biologicznych

Streszczenie rozprawy doktorskiej
napisanej 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.) **3**

1 Wprowadzenie **5**

2 Układy z przełączeniami **7**
2.1 Opis matematyczny 7
2.2 Układy z przełączeniami a układy biologiczne 8
2.3 Przegląd metod modelowania układów z przełączeniami 8

3 Wybrana metodologia analizy układów z przełączeniami **10**

4 Opis i analiza prostych modeli produkcji białka **12**
4.1 Wykorzystanie rozwiązań analitycznych modeli 13
4.2 Zastosowanie grafu tranzycji do analizy układu produkcji białka 14
4.3 Analiza punktów stacjonarnych w modelach produkcji białka 14
4.4 Heterogeniczność populacji komórkowej 15
4.5 Modele produkcji białka z losowym przełączeniem 15
4.6 Dyskusja 17

5 Model modułu regulatorowego białka p53 **20**
5.1 Opis modelu modułu regulatorowego białka P53 20
5.2 Rozwiązanie analityczne modelu białka p53 22
5.3 Graf tranzycji modelu modułu białka p53 22
5.4 Punkty stacjonarne w modelu 22
5.5 Heterogeniczność populacji komórkowej 23
5.6 Model białka p53 z losowym przełączeniem 24
5.7 Dyskusja 26

6 Podsumowanie **28**

Bibliografia **29**

Spis osiągnięć autorki **30**

Abstract (ang.)

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 imitated 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 heterogenic population. Localization of stationary point and bifurcation analysis presents possible behavior of the system for different range of parameters. Heterogenity of the population was investigated by two original algorithms. 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 heterogenic 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 depends on the strength of the external stimuli.

Rozdział 1

Wprowadzenie

Jednym z głównym celów badań nad funkcjonowaniem komórek jest lepsze poznanie różnic w zachowaniu komórek normalnych oraz dotkniętych procesem chorobowym, przykładowo nowotworami. Wsparciem dla badań laboratoryjnych, jest modelowanie matematyczne, które umożliwia teoretyczne badanie właściwości procesów. Wybór sposobu modelowania i struktury modelu jest uzależniony od charakteru modelowanego układu, dostępnej wiedzy oraz celu badań. Podstawowym problemem podczas modelowania jest znalezienie optimum pomiędzy skomplikowaniem modelu a jego zdolnością do odwzorowania dynamiki rzeczywistego systemu. Wraz ze wzrostem złożoności modelu na ogół wzrasta jego zdolność do przedstawienia skomplikowanej dynamiki, a jednocześnie wzrasta trudność w dobraniu parametrów oraz analizie. W przedstawionej rozprawie doktorskiej zaprezentowane są możliwości zastosowania układów z przełączeniami do modelowania procesów biologicznych. Podstawowe założenie podczas tworzenia układów z przełączeniami polega na podziale systemu na funkcjonalne części różniące się dynamiką. Każdy podsystem opisuje zachowanie 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 bądź reakcji enzymatycznej, które w tradycyjnym podejściu wykorzystującym ODE modelowane są zazwyczaj silnie nieliniowymi, a przez to trudnymi w analizie zależnościami. Układy z przełączeniami, ze względu na swoją kompartmentalną strukturę, mogą być analizowane nie tylko na drodze numerycznych symulacji ale również metodami analitycznymi. W celu kompleksowej analizy układów kawałkami liniowych zaproponowałam schemat postępowania uwzględniający różne techniki analizy: metody znane z literatury oraz autorskie rozwiązania symulacji populacji heterogenicznej, czyli odwzorowującej rzeczywistą populację komórkową. Zaproponowany algorytm został zilustrowany poprzez analizę dwóch różnych systemów biologicznych: prostych układów produkcji białka z autoregulacją (jeden ze sprzężeniem dodatnim, drugi ujemnym) oraz modułu regulatorowego białka p53.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie kompleksowej metody opisu i analizy złożonych układów biologicznych przy wykorzystaniu metodyki układów z przełączeniami. Zaproponowana przeze mnie metoda została zilustrowana za pomocą dwóch stworzonych modeli kawałkami linowych, pozwalając na ich lepsze scharakteryzowanie. Badania, wykonane w ramach prac nad rozprawą można podzielić na kilka zadań: identyfikacja procesów wewnątrzkomórkowych, które mogą być modelowane za pomocą skokowej zmiany układu, budowa modeli układów biologicznych przy wykorzystaniu metodyki układów

z przełączeniami, analiza stabilności modeli, analiza wpływu losowej lokalizacji progu aktywacji procesu na różnorodność odpowiedzi wewnątrzpopulacyjnej, analiza wpływu losowej aktywacji procesu na zróżnicowanie odpowiedzi populacji komórkowej.

Przeprowadzone badania pozwoliły na postawienie 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 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 oraz wpływa na zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej.

Rozdział 2

Układy z przełączeniami

Układy z przełączeniami stanowią pomost pomiędzy systemami prostymi, liniowymi a złożonymi, nieliniowymi. Układy te łączą zalety modelowania liniowego (prostota opisu i analizy) z zaletami układów nieliniowych (opis złożonej, silnie nieliniowej dynamiki). Przełączenia pomiędzy podukładami mogą tworzyć skomplikowaną dynamikę, umożliwiając powstanie oscylacji, cykli granicznych, bistabilności czy chaosu. Z drugiej strony podukłady są opisywane przez modele liniowe, które są stosunkowo proste w analizie, ze względu na możliwość wykorzystania wielu narzędzi do liniowej i multiliniowej analizy.

2.1 Opis matematyczny

Układ z przełączeniami to układ dynamiczny, który składa się ze skończonej liczby podukładów (podsystemów, domen) oraz reguł logicznych, które określają zasady przełączenia pomiędzy podukładami [1, 2]. Zachowanie układu w poszczególnych domenach jest zazwyczaj opisywane poprzez zbiór równań różniczkowych:

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

gdzie $x \in \mathbb{R}^n$ to stan układu, $u \in \mathbb{R}^m$ to sterowanie, natomiast zbiór $\mathcal{I}$ oznacza kolekcję dyskretnych podukładów. Reguła logiczna, która określa przełączenia między podukładami generuje sygnał przełączający $\sigma : \mathbb{R}^+ \to \mathcal{I}$. Aktywny podukład w chwili czasu t oznaczony jest indeksem $i = \sigma(t)$ [1]. Ze względu na typ przełączeń między układami wyróżniane są układy zależne od czasu i zależne od stanu.

Szczególną podgrupą układów z przełączeniami są układy kawałkami liniowe (ang. *piece-wise linear differential equation (PLDE) models*) [3]. Modele takie można zastosować do modelowania systemów biologicznych, ponieważ podstawowe procesy biologiczne (np. produkcja, degradacja) mogą być opisane liniowymi członami, a reakcje nieliniowe, tj. enzymatyczne lub procesy aktywacji genów, mogą być opisane poprzez przełączenie pomiędzy podukładami i zmianę wartości parametrów. Przykładowe równanie kawałkami liniowe opisujące zmiany poziomu białka może przyjąć formę:

$$\frac{dx_i}{dt} = p_i(X) - d_i(X)x_i, \quad i = 1, ...n, \tag{2.2}$$

gdzie x_i – liczba cząsteczek danego białka, p_i – współczynnik produkcji białka, d_i – współczynnik degradacji, natomiast $X = X(x)$ jest zbiorem zmiennych przełączających. Model

ten uwzględnia tylko produkcję i degradację, ale tempa tych procesów mogą być różne w zależności od stanu układu lub czasu. W przypadku układów z przełączeniami zależnymi od stanu, progi przełączeń θ, leżące na kolejnych zmiennych, dzielą całą przestrzeń stanu na domeny, w których odpowiednie zmienne przełączające (Z) przyjmują wartości 0 (poziom białka poniżej wartości progowej) lub 1 (poziom białka powyżej wartości progowej).

2.2 Układy z przełączeniami a układy biologiczne

Zastosowanie układów z przełączeniami do opisu i analizy badanego układu pozwala na ominięcie wielu problemów spotykanych przy podejściu tradycyjnym, na przykład za pomocą ODE. Przykładowo, podczas modelowania matematycznego napotyka się wiele problemów, których rozwiązanie może być ułatwione dzięki zastosowaniu układów z przełączeniami. Podczas modelowania procesów cząsteczek o różnych licznościach pojawia się problem wyboru typu modelu: ciągły czy dyskretny. Stosując układy z przełączeniami możliwe jest podzielenie układu na część ciągłą oraz dyskretną. Ciągła część układu może być wykorzystana do np. do opisu zmiany stężeń białka, natomiast dyskretna pozwala opisać nagłe zmiany w układzie, takie jak skokowa zmiana stanu genu. Ponadto większość procesów wewnątrzkomórkowych zachodzi tylko w obecności cząsteczek regulujących ich przebieg. Zmiana tempa reakcji jest często opisywana przez silnie sigmoidalne funkcje (np. funkcja Michaelisa-Menten czy funkcja Hilla [4]), lecz można również modelować ją przy wykorzystaniu funkcji skokowej. W efekcie system jest dzielony na dwa podsystemy, co pozwala opisać zachowanie układu przy niskim i przy wysokim stężeniu enzymu, wykorzystując jedynie proste liniowe funkcje oraz przełączenie. Ponadto dobór parametrów funkcji liniowych jest znacznie łatwiejszy niż funkcji nieliniowych, tym bardziej że wyniki eksperymentalne często określane są w stosunku do kontroli, co łatwo jest odnieść do różnych wartości parametrów w różnych domenach.

2.3 Przegląd metod modelowania układów z przełączeniami

Powszechnie stosowanym podejściem do modelowania procesów wewnątrzkomórkowych jest zastosowanie modeli nieliniowych, jednakże istnieją doniesienia literaturowe o zastosowaniu układów z przełączeniami i proponowanej ich analizie, aczkolwiek analiza ta jest ograniczona do pewnych, określonych właściwości systemu, a ponadto w większości przypadków przedstawione algorytmy wymuszają bardzo ograniczoną strukturę układu. Jedną z cech układów kawałkami liniowych jest możliwość analitycznego wyznaczenia lokalizacji punktów stacjonarnych – zwyczajnych i osobliwych [5], których obecność i charakter opisuje typ i stabilność odpowiedzi. W większości proponowanych metod analizy układów z przełączeniami i wyznaczania punktów stacjonarnych wprowadzane są założenia, które ograniczają możliwości modelowania rzeczywistych układów. Na przykład, zmiana poziomu zmiennych jest opisana wyłącznie procesami produkcji i degradacji [3, 6] lub zakłada się stałe tempo degradacji, niezależne od stanu układu [7, 8]. Założenia takie znacząco upraszczają analizę, a jednocześnie zmniejszają stosowalność takiego podejścia do rzeczywistych układów biologicznych. Natomiast w pracy Plathe i wsp. [9] jest zaproponowana metoda analizy modeli uwzględniających również transport, ale przedstawiona procedura określania pozycji oraz stabilności osobliwych punktów stacjonarnych wymaga wyliczenia rozszerzenia wielomianu charakterystycznego macierzy pochodnych, przez co obliczenia

mogą być bardzo skomplikowane, szczególnie w przypadku dużej liczby różnych regionów do zbadania.

W niniejszej pracy nacisk został położony na analizę modeli jak najbardziej oddających rzeczywistość, co wyklucza stosowanie metod zakładających stałe i jednakowe tempa degradacji jak w pracach [7, 8] i zakłada wykorzystanie biologicznie uzasadnionych wartości parametrów. Ponadto w zaproponowanych modelach uwzględniony jest również proces transportu (z cytplazmy do jądra) oraz produkcji białka na matrycy mRNA, które są kluczowe do odpowiedniego opisania dynamiki układów biologicznych. W efekcie metody wyznaczania osobliwych punktów stacjonarnych zaproponowane w publikacjach [3, 6] mogą nie wykazać istnienia punktu SSP. Z tego powodu w niniejszej pracy zaproponowano modyfikację metody wyznaczania Δ-regionów, w których mogą występować osobliwe punkty stacjonarne, poprzez uwzględnienie nie tylko zależności zmiennych od zmiennych przełączających, ale również zależności od innych zmiennych.

Układy kawałkami liniowe mogą być również analizowane jakościowo poprzez zdefiniowanie jakościowych stanów, które odpowiadają podukładom w przestrzeni stanu [10, 11]. W modelach takich przejścia między jakościowymi stanami odpowiadają przejściu pomiędzy podukładami. Główna zaleta takiego podejścia to brak konieczności określania konkretnych wartości parametrów, jednakże otrzymywane wyniki są znacznie mniej precyzyjne, a możliwości ich analizy są ograniczone.

Modele stochastyczne stanowią ważną część współczesnej biologii systemów, ze względu na możliwość uwzględnienia losowości procesów, co pozwala na badanie zróżnicowania populacji. Przykładem połączenia modeli stochastycznych z układami z przełączeniami są modele kawałkami deterministyczne (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*) [12, 13]. Bazując na teoretycznych podstawach modelowania układów, zaproponowałam algorytm łączący modelowanie deterministyczne (przy pomocy algorytmu Runge-Kutty) oraz losowość przełączeń między podsystemami. Losowość przełączeń ma duży wpływ na otrzymywane wyniki: zaszumienie przebiegów czasowych, czas aktywacji odpowiedzi, desynchronizację oscylacji.

Rozdział 3

Wybrana metodologia analizy układów z przełączeniami

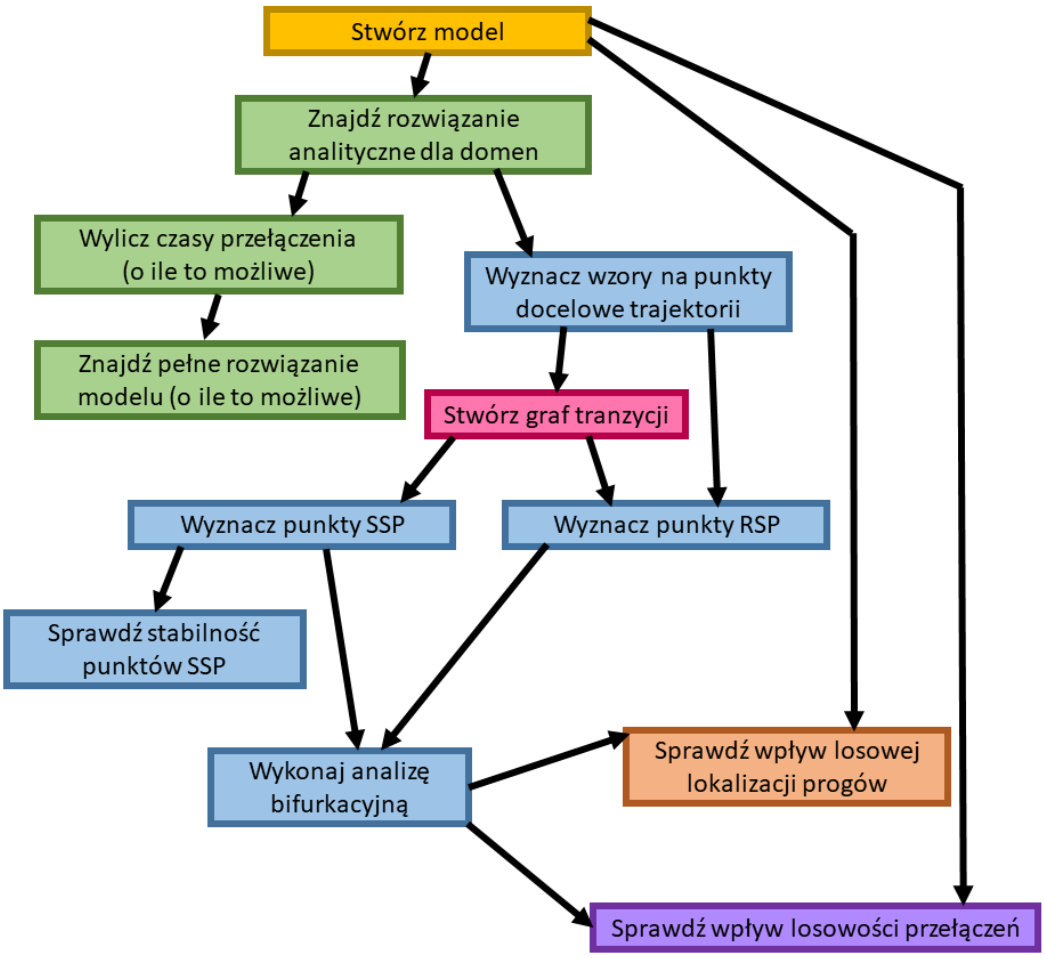
W przeciwieństwie do modeli silnie nieliniowych, w przypadku modeli liniowych istnieją metody analitycznego badania ich właściwości. W niniejszej rozprawie doktorskiej zaproponowałam kompleksowy algorytm analizy biologicznych modeli z przełączeniami. Pierwszym krokiem algorytmu jest analityczne rozwiązanie modelu w poszczególnych domenach oraz (jeśli to możliwe) wyznaczenie czasów przełączenia i rozwiązania analitycznego pełnego układu. Następnie na podstawie rozwiązań analitycznych w poszczególnych domenach należy wyznaczyć punkty docelowe, które mogą być wykorzystane do stworzenia grafu tranzycji. Graf taki jest przydatny w jakościowej ocenie zachowania układu i ułatwia wnioskowanie o możliwości wystąpienia punktów stacjonarnych oraz cykli granicznych. Następnym krokiem jest wyznaczenie punktów stacjonarnych. W przypadku zwyczajnych punktów stacjonarnych procedura postępowania jest bardzo intuicyjna i wymaga jedynie wyliczenia lokalizacji punktów docelowych i określenia ich lokalizacji względem wartości progowych. Natomiast wyznaczenie osobliwych punktów stacjonarnych jest znacznie trudniejsze. w niniejszej pracy proponuję zastosowanie w tym celu algorytmu Mestla i współpracowników [3], przy uwzględnieniu, że w przypadku modeli z transportem lub zmianą formy 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 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 ilość 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. Każda komórka w populacji ma ustalaną wartość progową na drodze losowania wartości z rozkładu normalnego o średniej równej nominalnej wartości progowej. Zastosowanie różnych odchyleń standardowych pozwala na

otrzymanie populacji o różnym stopniu zróżnicowania właściwości i w efekcie różnych odpowiedziach na ten sam bodziec.

Alternatywnie proponuję wykonanie symulacji układów kawałkami deterministycznych 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 Runge-Kutty z 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 w czasie.

Schemat zaproponowanej metody analizy układów z przełączeniami jest przedstawiony na rys. 3.1.

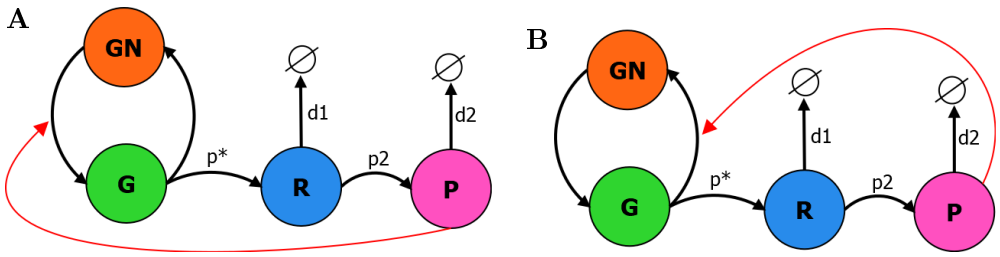


Rysunek 3.1: Schemat analizy układów z przełączeniami.

Rozdział 4

Opis i analiza prostych modeli produkcji białka

W celu przetestowania i zilustrowania zaproponowanej metodologii, w pierwszej kolejności wykorzystałam układ produkcji białka bazujący na centralnym dogmacie biologii molekularnej [4]. Stworzyłam dwa modele produkcji białka: jeden ze sprzężeniem dodatnim i jeden ze sprzężeniem ujemnym. W układzie bez przełączeń nie występują przełączenia, dlatego jego analiza nie została wykonana. Obydwa modele zawierają dwie zmienne: mRNA (R) oraz białko (P). Ilość aktywnych genów jest zawarta niejawnie w wartościach parametrów produkcji: tempo produkcji mRNA może być wolne (jeden gen aktywny) lub szybkie (dwa geny aktywne). Model zawiera ponadto procesy degradacji mRNA i białka oraz produkcję białka (rys. 4.1). W modelu występuje jedna wartość progowa θ_P, która dzieli układ na



Rysunek 4.1: Model produkcji białka. A. ze sprzężeniem dodatnim. B. ze sprzężeniem ujemnym.

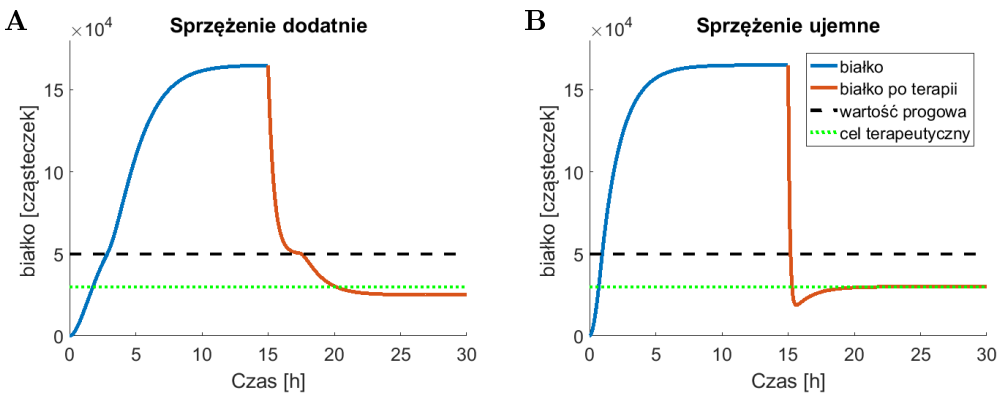
domeny z niskim poziomem białka $\{0\}$ oraz z wysokim poziomem białka $\{1\}$. Przełączenia w modelu występują w postaci zmiennej przełączającej Z_P, której wartość zależy od stanu układu, czyli liczby cząsteczek białka:

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

Równania modelu opisujące zmianę poziomu mRNA i białka są następujące:

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

$$\frac{d\,P(t)}{d\,t} = p_2 R(t) - d_2 P(t). \tag{4.3}$$



Rysunek 4.2: Przebiegi czasowe poziomu białka w układzie A. ze sprzężeniem dodatnim. B. ze sprzężeniem ujemnym.

Tempo produkcji mRNA, parametr $p*$, jest równy sumie tempa produkcji z obydwóch genów i zależy od wartości Z_P oraz typu autoregulacji. W układzie ze sprzężeniem dodatnim jeden gen jest stale aktywny, a drugi gen jest aktywowany przy wysokim poziomie białka, natomiast w układzie ze sprzężeniem ujemnym obydwa geny są aktywne, gdy poziom białka jest niski, a wzrost poziomu białka powoduje wyłączenie jednego genu:

$$\text{dodatnie: } p^* = p_p + p_p Z_P, \qquad \text{ujemne: } p^* = 2p_n - p_n Z_P. \tag{4.4}$$

Dodatkowo do powyższych modeli wprowadziłam kolejne przełączenie, które pozwoliło na zamodelowanie prostej terapii stosowanej w celu obniżenia poziomu białka. Założyłam, że celem terapeutycznym będzie obniżenie poziomu białka poniżej $P_{target} = 30\,000$. cząsteczek. Terapia jest modelowana jako przełączenie zależne od czasu: po czasie t_D układ zmienia swoją postać, a do równania opisującego poziom białka dodawany jest człon opisujący degradację białka indukowaną przez lek:

$$\frac{d\,P(t)}{d\,t} = p_2 R(t) - (d_2 + d_{2D}\, DRUG(t > t_D))P(t), \tag{4.5}$$

gdzie $DRUG$ to liczba cząsteczek leku, d_{2D} to tempo degradacji indukowanej przez lek. Parametry w modelach zostały dobrane tak, aby przed podaniem leku poziom białka w obu układach był taki sam, a po podaniu leku był osiągnięty cel terapeutyczny (rys. 4.2).

4.1 Wykorzystanie rozwiązań analitycznych modeli

Na podstawie równań różniczkowych, wyznaczyłam rozwiązanie analityczne układu w domenach. W zależności od wartości parametrów postać czasowa jest różna, a dla dobranych przeze mnie parametrów $d_1 = d_2$ jest następująca:

$$R(t) = \frac{p^*}{d_1} + \left(R(0) - \frac{p^*}{d_1}\right)e^{-d_1 t} \tag{4.6}$$

$$P(t) = \frac{p^* p_2}{d_1^2} + p_2(R(0) - \frac{p^*}{d_1})te^{-d_1 t} + (P(0) - \frac{p_2 p^*}{d_1^2})e^{-d_1 t}, \tag{4.7}$$

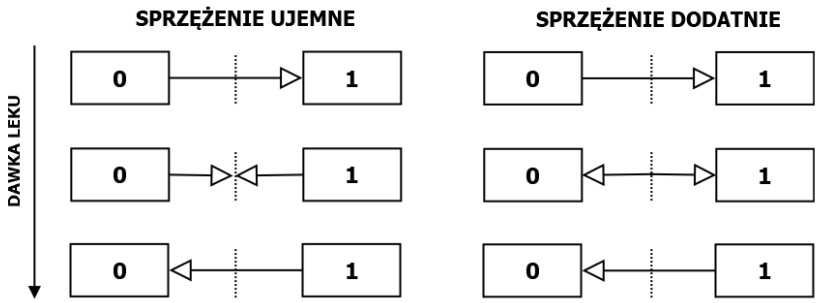
i nie jest możliwe wyznaczenie analitycznie czasu przełączenia. Następnie wykorzystując rozwiązanie analityczne wyznaczyłam wzory opisujące punkty docelowe:

$$\lim_{t\to\infty} R(t) = R_s = \frac{p*}{d_1}, \tag{4.8}$$

$$\lim_{t\to\infty} P(t) = P_s = \frac{p^* p_2}{d_1\left(d_2 + d_{2D}DRUG\right)}. \tag{4.9}$$

4.2 Zastosowanie grafu tranzycji do analizy układu produkcji białka

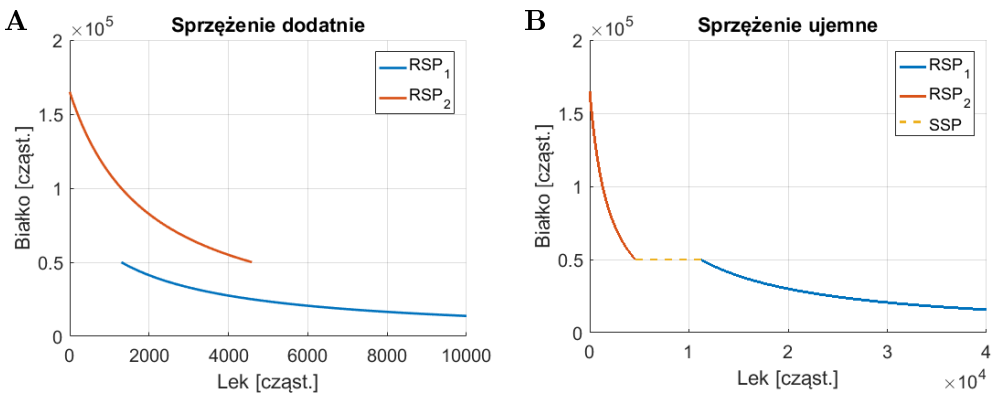
Ze względu na istnienie jednej wartości progowej graf składa się z dwóch węzłów (domen) oraz jednego łuku pokazującego kierunek przejścia między nimi. Kierunek przejścia pomiędzy domenami zależy od wartości parametrów oraz struktury układu. Różne zachowania układów w zależności od dawki leku oraz rodzaju autoregulacji przedstawiłam na grafach przejścia (rys. 4.3). Dla niskiej i wysokiej dawki leku zachowanie układu jest takie same w układzie ze sprzężeniem dodatnim oraz ujemnym. Dla pośrednich dawek leku w układzie ze sprzężeniem ujemnym trajektorie zbiegają się do granicy, a w układzie ze sprzężeniem dodatnim uciekają od granicy.



Rysunek 4.3: Graf tranzycji dla modeli produkcji białka ze sprzężeniem dodatnim oraz ujemnym w zależności od dawki leku. przerywane linie – granice między domenami.

4.3 Analiza punktów stacjonarnych w modelach produkcji białka

Dzięki wyznaczeniu punktów stacjonarnych, zwyczajnych (RSP) i osobliwych (SSP) uzyskałam informacje o możliwych typach odpowiedzi w komórce przy różnych dawkach leku. w obu układach wraz ze wzrostem dawki leku poziom białka obniża się. W układzie ze sprzężeniem dodatnim w zależności od dawki leku występuje jeden lub dwa punkty RSP (rys. 4.4 A). w układzie ze sprzężeniem ujemnym może występować jeden punkt RSP lub jeden punkt SSP (rys. 4.4 B).



Rysunek 4.4: Wykresy bifurkacyjne poziomu białka od dawki leku. A. Model ze sprzężeniem dodatnim. B. Model ze sprzężeniem ujemnym.

4.4 Heterogeniczność populacji komórkowej

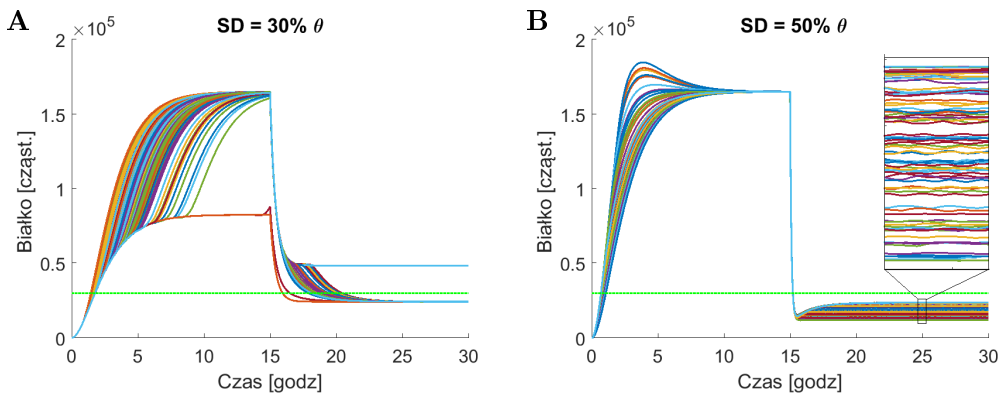
Kolejnym etapem postulowanej metodologii badania modeli biologicznych jest analiza odpowiedzi heterogenicznej populacji. Różna wrażliwość komórki na czynniki regulatorowe, odpowiedzialne za aktywację lub deaktywację genu, jest modelowana poprzez losową lokalizację wartości progowej (rozkład normalny o średniej równej θ_P i odchyleniu standardowym wyrażonym jako procent wartości progowej). Obniżenie wartości progowej odpowiada zwiększonej wrażliwości na czynniki regulatorowe, natomiast podwyższenie występuje w komórce o małej wrażliwości. W niniejszych rozdziale wykonałam symulacje populacji złożonej z 1000 komórek, w której podawano lek po 15 godzinach od rozpoczęcia symulacji.

Przesunięcie wartości progowej θ_P skutkuje zmianą czasu przełączenia, czyli chwili, w której akumulacja białka umożliwia aktywację/deaktywację genu. 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 pojawia się zróżnicowanie trajektorii czasowych startujących z tego samego warunku początkowego. Po podaniu leku populacja dzieli się na dwie części, w jednej z nich poziom białka jest poniżej wartości docelowej P_{target} a w drugiej powyżej, przez co cel terapeutyczny nie zawsze jest realizowany (rys. 4.5 A). w modelu ze sprzężeniem ujemnym w przebiegach czasowych części komórek można zaobserwować przeregulowanie. Po podaniu leku następuje gwałtowne obniżenie poziomu białka, odpowiedź układu jest szybka, a jego końcowe wartości są zróżnicowane, co związane jest z oscylacjami białka wokół punktu SSP (rys. 4.5 B).

Powyższe wyniki wykazują, że różnicowanie wrażliwości komórek na czynniki regulatorowe ma różny wpływ na odpowiedź populacji w zależności od typu sprzężenia występującego w układzie.

4.5 Modele produkcji białka z losowym przełączeniem

Aktywacja i deaktywacja genu jest procesem losowym, zależnym od przyłączenia się odpowiednich cząsteczek regulatorowych oraz czynników transkrypcyjnych. Wraz ze wzrostem ilości czynników transkrypcyjnych wzrasta prawdopodobieństwo aktywacji danego genu, natomiast wzrost ilości inhibitora transkrypcji powoduje zwiększenie prawdopodobieństwa



Rysunek 4.5: Przebiegi czasowe poziomu białka w populacji heterogenicznej . A. Model ze sprzężeniem dodatnim. B. Model ze sprzężeniem ujemnym. (zielona linia – cel terapeutyczny).

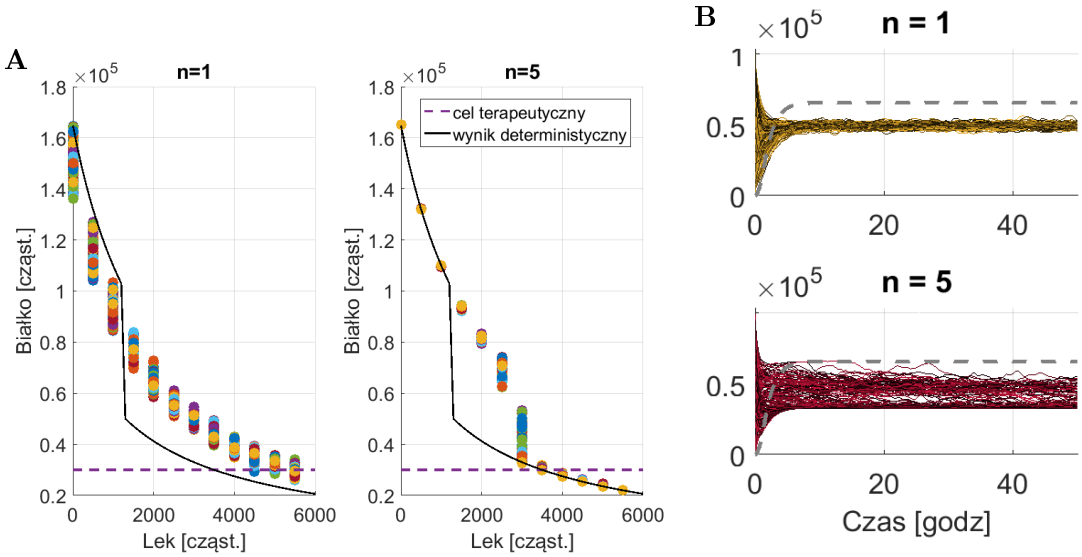
deaktywacji genu. Aby zamodelować losowość procesu przełączenia genu, w niniejszej rozprawie proponuję wprowadzenie modyfikacji algorytmu deterministycznego o etap określenia stanu genu. Stan genu, pośrednio opisywany w stworzonym modelu jako zmienna Z_P, jest zależny od funkcji prawdopodobieństwa, którą definiuję jako:

$$r(P) = \frac{P^n}{P^n + \theta_P^n}, \tag{4.10}$$

gdzie n to współczynnik Hilla opisujący skośność funkcji. Aby określić, czy gen jest aktywny czy nie, losuję liczbę z rozkładu równomiernego i porównuję ją z wartością funkcji $r(P)$. W modelu ze sprzężeniem dodatnim, jeśli wartość losowa jest mniejsza od $r(P)$ to gen jest aktywny, a w układzie ze sprzężeniem ujemnym sytuacja jest odwrotna: jeśli wartość losowa jest mniejsza od $r(P)$ to gen jest nieaktywny. Wraz ze wzrostem ilości cząsteczek białka wzrasta prawdopodobieństwo aktywacji genu w układzie ze sprzężeniem dodatnim lub deaktywacji w układzie ze sprzężeniem ujemnym. Dla wysokich wartości parametru Hilla (w tym przypadku $n = 5$) układ jest hiperwrażliwy na zmianę ilości cząsteczek białka w bliskiej okolicy wartości progowej, a funkcja prawdopodobieństwa ma kształt 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 przy dużej liczności białka proces nadal może być nieaktywny.

Aby zbadać zależność między zróżnicowaniem populacji komórkowej o różnych typach autoregulacji a minimalną, efektywną dawką leku wykonałam symulacje stochastyczne populacji komórkowych (każda po 500 komórke) o różnej losowości procesu (różne n) i po podaniu różnych dawek leku. W układzie ze sprzężeniem dodatnim hiperwrażliwość populacji na próg aktywacji genu powoduje bardzo małe zróżnicowanie populacji po podaniu dużej lub małej dawki leku, a bardzo duże zróżnicowanie po podaniu średnich dawek leku (rys. 4.6 a prawy). w przypadku układu mało wrażliwego na próg aktywacji ($n = 1$) zróżnicowanie populacji zmniejsza się wraz ze wzrostem dawki (rys. 4.6 a lewy). Jednocześnie wraz ze wzrostem stochastyczności przełączenia obserwuje się spadek wrażliwości układu na lek, przez co skuteczna dawka jest wyższa niż w modelu deterministycznym. Duże zróżnicowanie populacji o $n = 5$ (po podaniu 3 tys. cząsteczek leku) wynika z istnienia

w układzie dwóch punktów stacjonarnych, które powodują podział populacji na dwie części (rys. 4.6 B). w układzie o $n = 1$ dawka ta nie powoduje podziału populacji, a przebiegi czasowe mają charakter białego szumu (rys. 4.6 B).



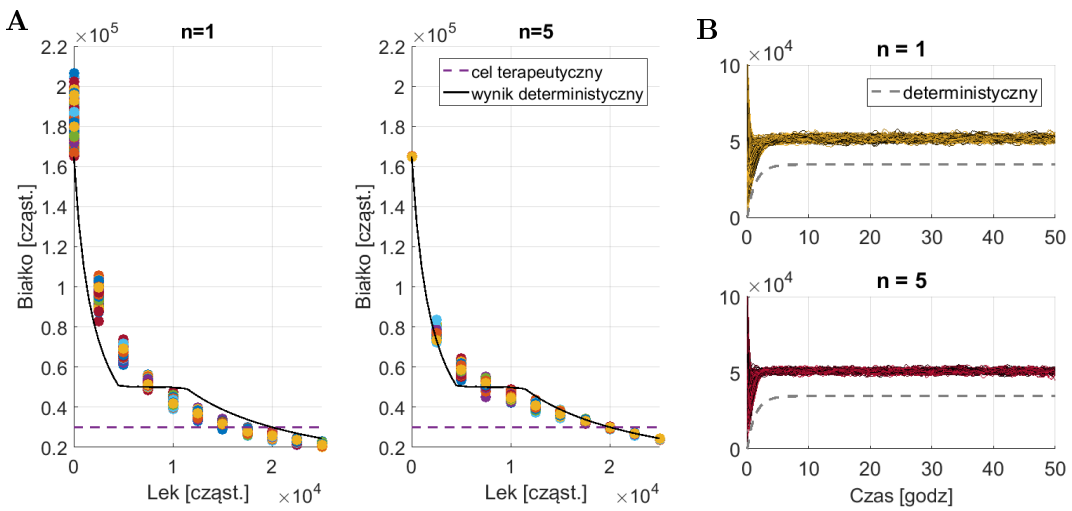
Rysunek 4.6: Stochastyczna odpowiedź populacji na różne dawki leku (sprzężenie dodatnie). A. Końcowy poziom białka w populacji o $n = 1$ i $n = 5$. B. Przebieg poziomu białka po podaniu 3 000 cząst. leku. Szara przerywana linia – odpowiedź deterministyczna.

W układzie ze sprzężeniem ujemnym wraz ze wzrostem dawki leku spada zróżnicowanie poziomów białka w ostatniej chwili symulacji w układzie o dużej losowości przełączeń. W układzie o małej losowości ($n = 5$) największe zróżnicowanie występuje dla średnich dawek leku (rys. 4.7 A). w przeciwieństwie do układu ze sprzężeniem dodatnim, w tym układzie zróżnicowanie wynika z obecności punktu SSP i oscylacji trajektorii wokół wartości progowej (rys. 4.7 B). Układ hiperwrażliwy ($n = 5$) ma zawsze mniejsze lub porównywalne zróżnicowanie poziomów białka do układu o małej wrażliwości na wartości progowe ($n = 1$). Ponadto wraz ze wzrostem losowości przełączeń spada wartość skutecznej dawki leku (rys. 4.7 A).

4.6 Dyskusja

Dzięki przełączeniom między podsystemami można modelować skokową zmianę struktury i/lub wartości parametrów, dzięki czemu nawet stosunkowo prosty, kawałkami liniowy 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 różnych typów autoregulacji w prostych systemach produkcji białka.

Systemy ze sprzężeniem dodatnim, występujące w sieciach wewnątrzkomórkowych, pozwalają na wzmocnienie i utrzymanie sygnału w komórce, co jest wykorzystywane na przykład w kaskadach sygnałowych. W przedstawionym powyżej modelu widać, że układ ze sprzężeniem dodatnim jest bardziej wrażliwy na oddziaływania zewnętrzne niż układ ze



Rysunek 4.7: Stochastyczna odpowiedź populacji na różne dawki leku (sprzężenie ujemne). A. Końcowy poziom białka w populacji o $n = 1$ i $n = 5$. B. Przebieg poziomu białka po podaniu 7 500 cząst. leku. Szara przerywana linia – odpowiedź deterministyczna.

sprzężeniem ujemnym, przez co efektywna dawka leku jest mniejsza (rys. 4.4), a jednocześnie dynamika układu jest znacznie wolniejsza. Na analizowanych przykładach, w modelu ze sprzężeniem ujemnym wykazałam możliwość wystąpienia oscylacji, wynikających z występowania osobliwego punktu stacjonarnego, natomiast w układzie ze sprzężeniem dodatnim potwierdziłam występowanie bistacjonarności dla pewnego zakresu parametrów. Obecność multistacjonarności w układzie jest również obserwowana w wynikach eksperymentów biologicznych jako różne typy odpowiedzi (np. [14]). Podział populacji na dwie części jest także widoczny w wynikach modelu ze sprzężeniem dodatnim zawierającym stochastyczne przełączenia. Powyższe wyniki pokazują, że aktywacja różnych typów odpowiedzi jest możliwa tylko w układach silnie zależnych od stężenia czynnika regulatorowego (wysoka wartość n). Dla niskich wartości n przełączenia stanu genu zachodzą bardzo często, co wynika z silnego nakładania się basenów przyciągania dwóch punktów stacjonarnych.

Heterogeniczność populacji, objawiająca się różną wrażliwością komórki na poziom czynników regulujących, wpływa zarówno na czas odpowiedzi jak i poziom końcowy białka. W układzie ze sprzężeniem dodatnim obserwuje się podział populacji na dwie subpopulacje o zdecydowanie różnych poziomach białka, które można przewidzieć na podstawie analizy położenia punktów RSP w stosunku do wartości progowej. Ponadto zróżnicowanie populacji spowodowało, że nie wszystkie komórki osiągnęły cel terapeutyczny. 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. Powyższe obserwacje oraz wykonana analiza bifurkacyjna pozwalają potwierdzić pierwszą z stawianych tez, mówiącą o tym, że zmiany wartości progowych, odzwierciedlające różnice między komórkami, wpływają na osiągalność założonych celów terapeutycznych w sposób zależny od sprzężeń występujących w układzie.

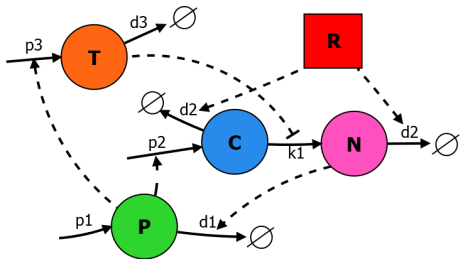
Zakres zmienności wewnątrzpopulacyjnej ma bardzo duże znaczenie przy określaniu wartości dawki, która przy minimalnej toksyczności zapewni zrealizowanie celu terapeutycznego. Wraz ze wzrostem losowości przełączeń w modelu ze sprzężeniem dodatnim obserwuje się wzrost efektywnej dawki leku, a w modelu ze sprzężeniem ujemnym spadek efektywnej dawki leku w porównaniu do rozwiązania deterministycznego. Nawet tak proste modele jak prezentowane w niniejszym rozdziale, dzięki wprowadzeniu przełączeń oraz losowości pozwalają na opis skomplikowanych procesów i złożonej dynamiki obserwowanej w układach biologicznych. Na podstawie powyższych wyników widoczne jest, że uwzględnienie stochastczności w przełączeniu między podsystemami pozwala na modelowanie obserwowanej biologicznie heterogeniczności populacji komórkowej, co potwierdza drugą tezę postawioną w niniejszej pracy.

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 [4]. Wybór tego modułu do analizy był podyktowany jego dużym znaczeniem dla prawidłowego funkcjonowania komórki oraz dużą ilością wyników eksperymentalnych oraz symulacyjnych, które pozwoliły na potwierdzenie poprawności otrzymanych wyników. Ze względu na złożoną dynamikę modułu regulatorowego białka p53, opisujące go modele matematyczne są silnie nieliniowe (np. [15]), a analiza ich zachowania opiera się na stochastycznych lub deterministycznych przebiegach czasowych, otrzymanych metodami numerycznymi. W niniejszej rozprawie, dzięki zastosowaniu układów kawałkami liniowych, wykonałam kompleksową analizę systemu, uwzględniającą m.in. rozwiązanie analityczne, tworzenie grafów tranzycji oraz wyznaczenie punktów stacjonarnych.

5.1 Opis modelu modułu regulatorowego białka P53



Rysunek 5.1: Struktura modelu modułu regulatorowego białka p53.

Regulacja poziomu białka p53 jest bardzo skomplikowana, dlatego tworząc model ograniczyłam się wyłącznie do dwóch, głównych pętli sprzężenia zwrotnego: dodatniej oraz ujemnej. p53 aktywuje ekspresję białka MDM2, które aktywuje proces degradacji p53 – sprzężenie ujemne. Natomiast sprzężenie dodatnie działa na zasadzie podwójnej negacji: p53 aktywuje ekspresję białka PTEN, które poprzez aktywację blokady transportu MDM2, zmniejsza degradację białka p53 [16]. W normalnych komórkach poziom p53 i PTEN jest niski, a MDM2 wysoki, natomiast po pojawieniu się czynnika stresowego wzrasta degradacja MDM2 i obserwuje się wzrost poziomu p53, które następnie aktywuje odpowiedź na stres. Opisane zależności zamodelowałam przy wykorzystaniu układów kawałkami liniowych, a wyniki wstępnych wersji modelu oraz wyniki analiz zostały częściowo opublikowane [17, 18, 19, 20]. Model zawiera zmienne: P – białko p53,

C – cytoplazmatyczne białko MDM2, N – jądrowe białko MDM2, T – białko PTEN, oraz wymuszenie R – stres, który powoduje uszkodzenie DNA i wzrost tempa degradacji MDM2 (jądrowego i cytoplazmatycznego) (rys.5.1). Równania tworzące model są następujące:

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

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

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

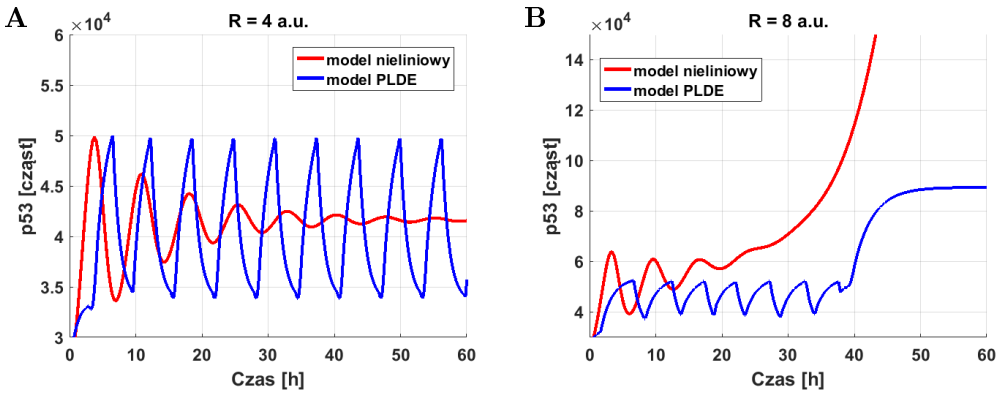
$$\frac{dT(t)}{dt} = p_3^*(P(t)) - d_3T(t). \tag{5.4}$$

W modelu istnieją 4 wartości progowe: θ_P, θ_{N1}, θ_{N2}, θ_T, które dzielą układ na 12 domen oraz odpowiadające im zmienne przełączające. Do jednoznacznego opisu domen zaproponowałam wykorzystanie wektora: $B = \{Z_P, Z_N, Z_T\}$, gdzie Z_P, Z_N oraz Z_T (ze względu na dwa progi dla zmiennej N, Z_N może mieć wartość 0, 1 lub 2). Parametry modelu których wartość zależy od domeny są oznaczone gwiazdką (*) i są zdefiniowane jako:

$$p_2^* = p_{20} + p_{21}Z_P, \qquad d_1^* = d_{10} + d_{11}Z_{N1} + d_{12} \cdot Z_{N2}, \tag{5.5}$$

$$p_3^* = p_{30} + p_{31}Z_P, \qquad k_1^* = k_{10} - k_{11}Z_T. \tag{5.6}$$

Porównując wyniki modelu kawałkami liniowego z analogicznym modelem nieliniowym autorstwa dr hab. Krzysztofa Puszyńskiego, widoczne jest, że podstawowa dynamika układu jest podobna. Przykładowo, przy średnich dawkach stresu w eksperymentach biologicznych obserwuje się oscylacje poziomu białka p53, wywołane działaniem ujemnej pętli sprzężenia [21]. Oscylacje również występują w obydwóch modelach przy średnim wymuszeniu ($R = 4$ a.u.). W modelu nieliniowym oscylacje są gasnące, natomiast w modelu kawałkami liniowym oscylacje są stałe (rys. 5.2B). Natomiast wysokie dawki stresu powodują w początkowym etapie odpowiedzi oscylacje a następnie gwałtowny wzrost poziomu p53, indukujący apoptozę [16], co również obserwowane jest w obydwóch modelach. Przebiegi czasowe pokazują, że modelowanie z przełączeniami pozwala na ograniczenie poziomów białek i dopasowanie modelu do wyników biologicznych (rys. 5.2B).



Rysunek 5.2: Porównanie przebiegów czasowych w modelu kawałkami liniowym i nieliniowym. A. $R = 4$ a.u. B. $R = 9$ a.u.

5.2 Rozwiązanie analityczne modelu białka p53

Model w poszczególnych domenach różni się jedynie wartościami parametrów, dlatego wyznaczone przeze mnie rozwiązanie analityczne ma taką samą formę w każdej z nich:

$$P(t) = \frac{p_1}{d_1^*} + \left(P_0 - \frac{p_1}{d_1^*}\right)e^{-d_1^* t}, \tag{5.7}$$

$$T(t) = \frac{p_3^*}{d_3} + \left(T_0 - \frac{p_3^*}{d_3}\right)e^{-d_3 t} \tag{5.8}$$

$$C(t) = \frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*} + \left(C_0 - \frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*}\right)e^{-(d_2(1+R)+k_1^*)t} \tag{5.9}$$

$$N(t) = \frac{k_1^* p_2^*}{d_2(1+R)(d_2(1+R)+k_1^*)} - \left(C_0 - \frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*}\right)e^{-(d_2(1+R)+k_1^*)t} + \\ + \left(N_0 + C_0 - \frac{p_2^*}{d_2(1+R)}\right)e^{-d_2(1+R)t}. \tag{5.10}$$

Na podstawie rozwiązania analitycznego wyznaczyłam wzory punktów docelowych, do którego zmierzają trajektorie.

$$\lim_{t\to\infty} P(t) = \frac{p_1}{d_1}, \qquad \lim_{t\to\infty} C(t) = \frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*}, \tag{5.11}$$

$$\lim_{t\to\infty} T(t) = \frac{p_3^*}{d_3}, \qquad \lim_{t\to\infty} N(t) = \frac{p_2^*}{d_2(1+R)} - \frac{p_2^*}{d_2(1+R)+k_1^*}. \tag{5.12}$$

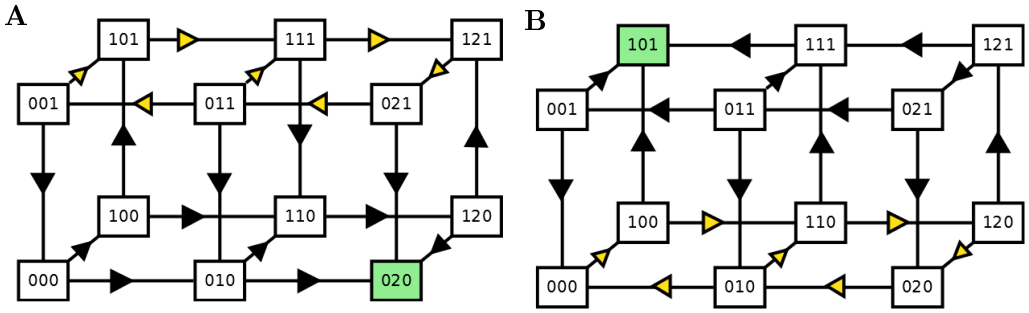
5.3 Graf tranzycji modelu modułu białka p53

Grafy tranzycji pozwalają na wizualizację zachowania układu poprzez schematyczne przedstawienie przejść pomiędzy domenami. Graf przejścia ma różną strukturę w zależności od stresu, np. w układzie bez stresu widzimy, że wszystkie trajektorie zbiegają się do domeny $\{020\}$, gdzie jest niski poziom p53 i PTEN a wysoki MDM2 (rys. 5.3 A). Natomiast wzrost dawki stresu ($R = 8$) spowodował zmianę kierunku przejścia trajektorii w strone domeny $\{101\}$, gdzie poziom p53 jest wysoki, co jest markerem apoptozy (rys. 5.3 B). Oczywiście zmiana kierunków strzałek następuje stopniowo, przy niższych dawkach, a pełna analiza została opublikowana w artykule [19]. Na podstawie przedstawionych grafów, można wnioskować, że dla podanych dawek stresu istnieje po jednym punkcie stacjonarnym odpowiednio w domenach $\{020\}$ o $\{101\}$. Ponadto na grafach kolorem żółtym zaznaczyłam cykle pomiędzy domenami, które sugerują, w których regionach może występować SSP.

5.4 Punkty stacjonarne w modelu

W zależności od wartości wymuszenia w modelu mogą występować zarówno zwyczajne jak i osobliwe punkty stacjonarne. Po zbadaniu pełnego zakresu wymuszeń, wyznaczyłam wartości stresu dla jakich istnieje punkt RSP w danej domenie.

- w domenie $\{020\}$ dla $R \in [0, 0.8635\rangle$ – stan natywny komórki,



Rysunek 5.3: Graf przejścia dla modelu z różnymi dawkami wymuszenia. A. $R = 0$ a.u. B. $R = 8$ a.u.

- w domenie $\{111\}$ dla $R \in \langle 1.0322, 1.9154\rangle$ – blokada cyklu bez oscylacji,
- w domenie $\{101\}$ dla $R \in \langle 1.9154, +\infty\rangle$ – aktywacja apoptozy.

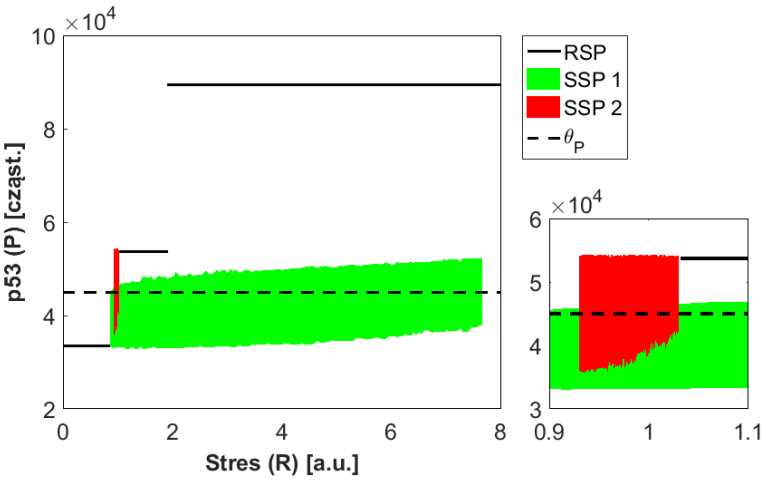
Występowanie punktu RSP można odnieść bezpośrednio do odpowiedniego typu odpowiedzi komórki. Następnie wyznaczyłam zakresy wymuszeń dla jakich występują punkty osobliwe i określiłam analitycznie ich stabilność. Punkty SSP występują w regionach:

- Δ-region $(\theta_P, C, \theta_{N2}, \theta_T)$ dla $R \in [0, 12.578\rangle$ – punkt niestabilny,
- Δ-region $(\theta_P, C, \theta_{N2}, T < \theta_T)$ dla $R \in \langle 0.8635, 7.7038\rangle$ – punkt na granicy stabilności (SSP 1),
- Δ-region $(\theta_P, C, \theta_{N2}, T > \theta_T)$ dla $R \in \langle 0.7059, 1.0322\rangle$ – punkt na granicy stabilności (SSP 2).

Punkty SSP znajdują się na przecięciu progów θ_P oraz θ_{N2}, co objawia się poprzez oscylacje przebiegów czasowych. Na wykresie 5.4 zaznaczono wartość białka p53 w zwyczajnych punktach stacjonarnych oraz zakres oscylacji wokół osobliwych punktów stacjonarnych. Wokół niestabilnego punktu SSP nie występują oscylacje. Oscylacje wokół punktu SSP2 występują dla mniejszego zakresu wymuszeń, niż wynikałoby to z obliczeń, ponieważ trajektoria cyklu natrafia na wartość progową i ucieka z jego basenu przyciągania. Niestety istnienie basenu przyciągania wokół punktów SSP można ocenić jedynie numerycznie, poprzez wykonanie symulacji.

5.5 Heterogeniczność populacji komórkowej

W celu zbadania heterogeniczności populacji komórkowej wykonałam serie eksperymentów, w których wprowadzałam losową lokalizację poszczególnych progów. Bazując na wynikach biologicznych wykazujących występowanie progów poziomu białka, które muszą być przekroczone, aby aktywować blokadę cyklu komórkowego a następnie apoptozę, [22], zaproponowałam wprowadzenie wartości progowych w celu podziału odpowiedzi komórkowej na 3 typy: normalne, zablokowane i apoptotyczne. Typ odpowiedzi był oceniony poprzez porównanie końcowego poziomu p53 z dwoma progami odcięcia: poziom poniżej pierwszego progu odpowiadał komórkom normalnym, poziom pomiędzy nimi blokadzie cyklu komórkowego,

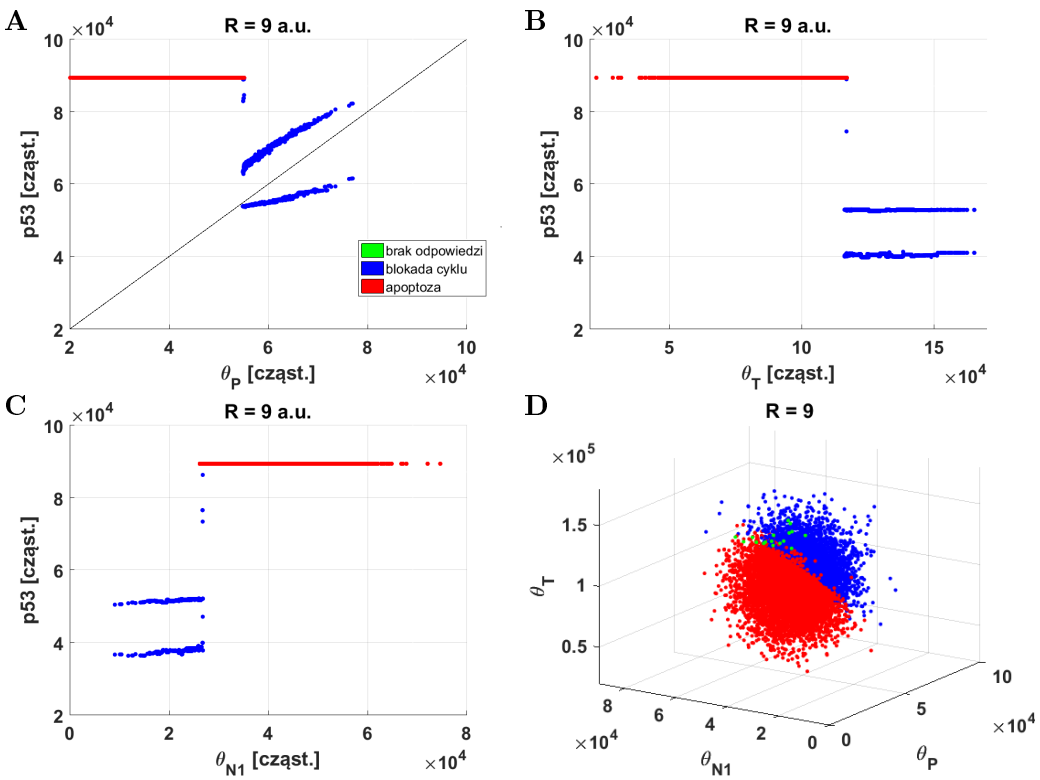


Rysunek 5.4: Wykres bifurkacyjny poziomu p53 w zależności od wymuszenia R. Po prawej stronie wykresów jest przedstawione powiększenie wykresu dla $R \in \langle 0.9, 1.1 \rangle$.

a poziom powyżej drugiego progu komórkom apoptotycznym. Różnice w lokalizacji wartości progowej θ_P odpowiadają zróżnicowaniu wrażliwości komórek na obecność czynników transkrypcyjnych. Niskie wartości progowe występują w komórkach, które bardzo łatwo aktywują transkrypcję genów MDM2 i PTEN, co ułatwia aktywację apoptozy po zadziałaniu dużą dawką stresu (rys. 5.5 A). Jednak w komórce o niskim θ_P nie występują oscylacje, ponieważ pętla sprzężenia ujemnego nie działa poprawnie. Natomiast mała wrażliwość na p53 utrudnia aktywację apoptozy nawet w bardzo uszkodzonych komórkach. Różna lokalizacja wartości progowej θ_T obrazuje populację o zróżnicowanej zdolności do aktywacji blokady transportu MDM2 do jądra. Wraz ze wzrostem tej wartości progowej spada zdolność komórki do aktywacji apoptozy, ponieważ konieczne jest nagromadzenie bardzo dużej ilości białka PTEN, aby aktywować sprzężenie dodatnie (rys. 5.5 B). Natomiast zróżnicowanie lokalizacji wartości progowych θ_{N1} oraz θ_{N2} pozwala modelować zachowanie populacji o zróżnicowanej zdolności do aktywacji degradacji białka p53. W przeprowadzonych symulacjach założyłam, że odległość między θ_{N2} i θ_{N1} jest stała, dlatego tylko wartość θ_{N1} była losowana z rozkładu normalnego, natomiast θ_{N2} była wyliczona. Podwyższenie tych wartości progowych ułatwia wzrost poziomu białka p53, ponieważ jego degradacja jest aktywowana przy wysokich poziomach jądrowego MDM2 (rys. 5.5 C). Oczywiście w rzeczywistej populacji obserwuje się zróżnicowanie progów aktywacji wszystkich procesów, dlatego rzeczywiste zróżnicowanie populacji może być bardzo duże. Wpływ jednoczesnego zróżnicowania lokalizacji wszystkich progów na los komórki jest przedstawiony na wykresie 5.5 D. Nawet przy dużych dawkach stresu jest mała grupa komórek, które nie aktywują odpowiedzi na uszkodzenia.

5.6 Model białka p53 z losowym przełączeniem

W celu zbadania wpływu losowości w procesie przełączania na rodzaj i czas aktywowanej odpowiedzi wprowadziłam do stworzonego modelu cztery funkcje losowe określające



Rysunek 5.5: Odpowiedź populacji heterogenicznej $R = 9$ a.u. A. Zależność końcowego poziomu p53 od losowej lokalizacji θ_P. B. Zależność końcowego poziomu p53 od losowej lokalizacji θ_T. C. Zależność końcowego poziomu p53 od losowej lokalizacji θ_{N1}. D. Zależność końcowego poziomu p53 od losowej lokalizacji θ_P, θ_T, θ_{N1}.

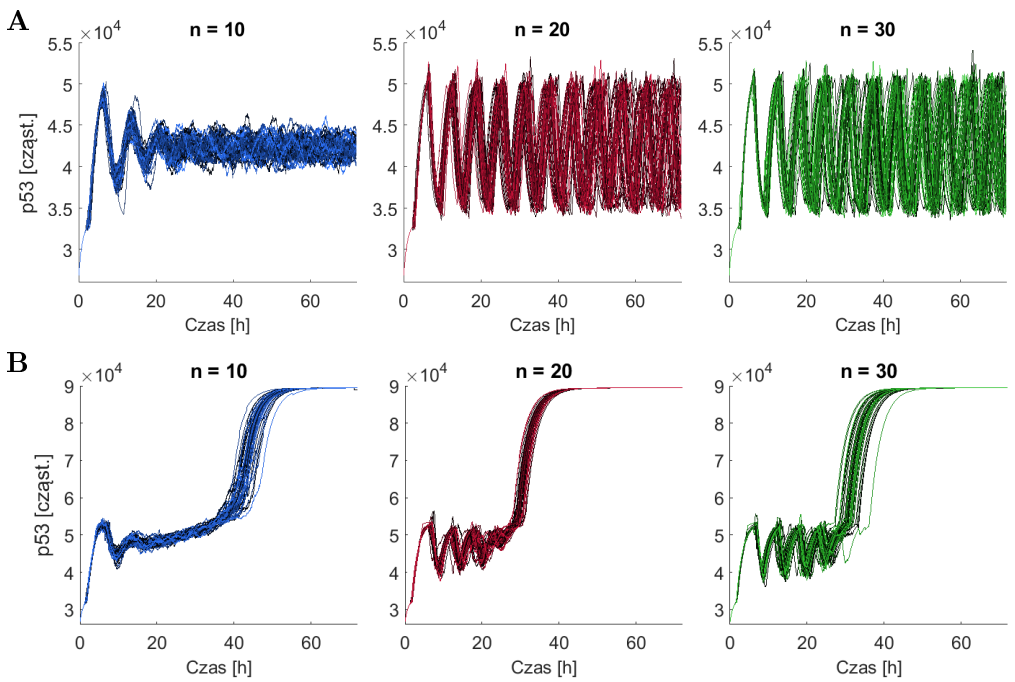
prawdopodobieństwo aktywacji procesu:

$$r(P) = \frac{P^n}{P^n + \theta_P^n} \qquad r(N_1) = \frac{N^n}{N^n + \theta_{N1}^n} \tag{5.13}$$

$$r(N_2) = \frac{N^n}{N^n + \theta_{N2}^n} \qquad r(T) = \frac{T^n}{T^n + \theta_T^n}. \tag{5.14}$$

Każda z powyższych funkcji przyjmuje wartości od 0 do 1 i ma kształt sigmoidalny, zależny od parametru n. Jako przykład przedstawię wyniki układów o różnej losowości na trzy dawki stresu. Pod wpływem dawki $R = 5$ a.u. w modelu deterministycznym obserwujemy oscylacje poziomu białka p53, natomiast wprowadzenie losowości powoduje desynchronizację oscylacji (przy $n = 30$ i $n = 20$), a przy mniejszych wartościach n również zmniejszenie amplitudy drgań, które mają charakter zbliżony do białego szumu, co wynika z bardzo częstych przełączeń między aktywnym i nieaktywnym procesem (rys. 5.6 A). Natomiast przy większej dawce stresu, wszystkie populacje są apoptotyczne, a wzrost losowości przełączeń spowodował wydłużenie czasu do aktywacji apoptozy (rys. 5.6 C).

Odpowiedź populacji jest ściśle związana ze specyficznością danej linii komórkowej. Specyficzność tą 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



Rysunek 5.6: Wyniki stochastyczne modelu białka p53 z różnym wymuszeniem i różnymi parametrami n. A. $R = 5$ a.u. B.$R = 8$ a.u.

przez p53, MDM2 i PTEN. W komórkach 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 do aktywacji apoptozy jest niższy w komórach o $n = 20$ niż $n = 10$. Populacja o bardzo wysokim n pozostaje w basenie przyciągania cyklu granicznego i tylko nieliczne komórki aktywują apoptozę. Przy dużych wartościach wymuszenia istnieje tylko jeden punkt stacjonarny, zatem wszystkie trajektorie ostatecznie do niego zmierzają, a wzrost wartości n skraca czas osiągnięcia tego punktu.

5.7 Dyskusja

Przedstawiony model białka p53 oraz jego analiza miały na celu scharakteryzowanie rzeczywistego układu biologicznego. Nawet tak uproszczony model umożliwił oddanie podstawowej dynamiki układu, a wykonana analiza pozwoliła lepiej określić jego cechy. Wyznaczyłam punkty stacjonarne – zwyczajne i osobliwe, a następnie powiązałam ich występowanie z obserwowanym zachowaniem komórek: stabilizacją poziomu białka w punkcie RSP oraz oscylacjami w punktach SSP. Niestety wyznaczenie stabilnego punktu SSP nie pozwala jednoznacznie stwierdzić występowania oscylacji w układzie, ponieważ trajektoria wokół SSP może natrafiać na inne wartości progowe, co nie jest uwzględnione w niniejszej metodzie.

Wykonana analiza heterogeniczności populacji poprzez wprowadzenie losowej lokalizacji progów pozwoliła na odwzorowanie populacyjnych wyników eksperymentalnych oraz zbadanie wpływu obniżonej/podwyższonej wrażliwości na czynniki regulatorowe na odpowiedź komórki. Symulacje takie pozwalają przewidzieć możliwy wpływ np. mutacji białka

na całościową odpowiedź komórki. Analiza wpływu umiejscowienia progów wykazała, że zwiększenie progu θ_P (np. zmniejszenie aktywność białka p53) negatywnie wpływa na zdolność do aktywacji apoptozy. Podobny efekt mają zwiększenie progu θ_T (np. utrudnienie aktywacji blokady transportu MDM2 do jądra) oraz zmniejszenie progów θ_{N1} i θ_{N2} (np. ułatwienie degradacji p53).

Dzięki wykonaniu analizy wpływu losowości aktywacji procesów enzymatycznych możliwe było odwzorowanie zróżnicowania odpowiedzi komórki na czynniki zewnętrzne. W populacji o małej losowości przełączeń aktywacja i deaktywacja procesu jest bardzo ściśle związana z wartością progową, dlatego przebiegi stochastyczne są zbliżone do przebiegu deterministycznego. Natomiast komórki z dużą losowością aktywacji mogą aktywować/deaktywować proces nawet przy poziomach białka dalekich od wartości progowej. W efekcie przebiegi są silnie zaszumione, po średniej dawce leku nie występują regularne oscylacje. Również czas aktywacji apoptozy po podaniu dużego stresu jest dłuższy niż w populacji hiperwrażliwej. Zwiększenie losowości przełączeń skutkuje wzrostem desynchronizacji odpowiedzi w czasie, zwiększeniem zaszumienia przebiegów oraz wpływa na zróżnicowanie odpowiedzi w sposób zależny od dawki. Wyniki te potwierdzają prawdziwość trzeciej tezy.

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 biologicznych 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), analitycznie 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 części populacji występuje brak osiągnięcia celu terapeutycznego).

Do 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 obserwowalnej biologicznie zmienności wewnątrzpopulacyjnej, takiej jak podział populacji na dwie subpopulacje.

Zaproponowana metodologia pozwoliła również zbadać wpływ stopnia zależności aktywacji procesu od poziomu czynników regulatorowych dzięki wprowadzeniu różnego stopnia losowości przełączeń. Wraz ze wzrostem losowości zaobserwowałam wzrost desynchronizacji oscylacji w czasie oraz zmniejszenie ich amplitudy a zwiększenie zaszumienia przebiegów czasowych. Na przykładzie modelu białka p53 wykazałam, że losowość przełączeń wpływa również na zróżnicowanie odpowiedzi komórkowej w sposób zależny od poziomu stresu.

Bibliografia

[1] Z. Sun, *Switched linear systems: control and design.* Springer Science & Business Media, 2006.

[2] D. Liberzon, *Switching in systems and control.* Springer Science & Business Media, 2003.

[3] T. Mestl, E. Plahte, and S. W. Omholt, "A mathematical framework for describing and analysing gene regulatory networks," *Journal of Theoretical Biology*, vol. 176, no. 2, pp. 291–300, 1995.

[4] B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Essential cell biology.* Garland Science, 2013.

[5] E. H. Snoussi and R. Thomas, "Logical identification of all steady states: the concept of feedback loop characteristic states," *Bulletin of Mathematical Biology*, vol. 55, no. 5, pp. 973–991, 1993.

[6] E. Plahte and S. Kjøglum, "Analysis and generic properties of gene regulatory networks with graded response functions," *Physica D: Nonlinear Phenomena*, vol. 201, no. 1-2, pp. 150–176, 2005.

[7] T. Mestl, E. Plahte, and S. W. Omholt, "Periodic solutions in systems of piecewise-linear differential equations," *Dynamics and stability of systems*, vol. 10, no. 2, pp. 179–193, 1995.

[8] R. Edwards, "Analysis of continuous-time switching networks," *Physica D: Nonlinear Phenomena*, vol. 146, no. 1-4, pp. 165–199, 2000.

[9] E. Plahte, T. Mestl, and S. W. Omholt, "A methodological basis for description and analysis of systems with complex switch-like interactions," *Journal of mathematical biology*, vol. 36, no. 4, pp. 321–348, 1998.

[10] B. Kuipers, "Qualitative simulation," *Artificial intelligence*, vol. 29, no. 3, pp. 289–338, 1986.

[11] H. De Jong, J.-L. Gouzé, C. Hernandez, M. Page, T. Sari, and J. Geiselmann, "Qualitative simulation of genetic regulatory networks using piecewise-linear models," *Bulletin of mathematical biology*, vol. 66, no. 2, pp. 301–340, 2004.

[12] M. H. Davis, "Piecewise-deterministic markov processes: A general class of non-diffusion stochastic models," *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, vol. 46, no. 3, pp. 353–376, 1984.

[13] R. Rudnicki and M. Tyran-Kamińska, *Piecewise deterministic processes in biological models*, vol. 1. Springer, 2017.

[14] R. J. Johnston Jr, S. Chang, J. F. Etchberger, C. O. Ortiz, and O. Hobert, "Micrornas acting in a double-negative feedback loop to control a neuronal cell fate decision," *PNAS*, vol. 102, no. 35, pp. 12449–12454, 2005.

[15] T. Sun, C. Chen, Y. Wu, S. Zhang, J. Cui, and P. Shen, "Modeling the role of p53 pulses in dna damage-induced cell death decision," *BMC bioinformatics*, vol. 10, no. 1, p. 190, 2009.

[16] K. H. Vousden and X. Lu, "Live or let die: the cell's response to p53," *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no. 8, pp. 594–604, 2002.

[17] M. Ochab, K. Puszynski, and A. Swierniak, "Application of the piece-wise linear models for description of nonlinear biological systems based on p53 regulatory unit," in *Proceedings of the XII National Conference on Applications of mathematics in biology and medicine*, pp. 85–90, 2016.

[18] M. Ochab, M. Kurpas, and W. Bensz, *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce,*, vol. Inzynieria w medycynie, ch. Systemy biologiczne jako układy z przełączeniami na przykładzie modułu regulatorowego p53, pp. 44–52. Poznań: Młodzi Naukowcy, 2016.

[19] M. Ochab, K. Puszynski, A. Swierniak, and J. Klamka, "Variety behavior in the piecewise linear model of the p53-regulatory module," in *Proceedings of the International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, pp. 208–219, Springer, 2017.

[20] M. Ochab, A. Swierniak, J. Klamka, and K. Puszynski, "Apoptotic regulatory module as switched control system - analysis of asymptotic properties," in *Proceedings of the 9th International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms*, pp. 119–126, 01 2018.

[21] R. L. Bar-Or, R. Maya, L. A. Segel, U. Alon, A. J. Levine, and M. Oren, "Generation of oscillations by the p53-mdm2 feedback loop: a theoretical and experimental study," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 97, no. 21, pp. 11250–11255, 2000.

[22] M. Kracikova, G. Akiri, A. George, R. Sachidanandam, and S. Aaronson, "A threshold mechanism mediates p53 cell fate decision between growth arrest and apoptosis," *Cell death and differentiation*, vol. 20, no. 4, p. 576, 2013.

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. 21th 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, 4th 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. 20th 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 11th 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 (MNiSW: 5 pt)

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. 2nd Erice International Conference on Mathematical and Computational Epidemiology, Erice (Sycylia), 28.08 – 5.09.2018
3. 11th 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. 20th 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. 19th 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, 11th q-bio Summer School, Fort Collins, Colorado, USA, 4-10.06.2017; temat kursu: *Cancer Dynamics*