



Silesian  
University  
of Technology

**POLITECHNIKA ŚLĄSKA**  
**WYDZIAŁ AUTOMATYKI, ELEKTRONIKI I INFORMATYKI**

Rozprawa doktorska

Modelowanie i analiza wybranych mechanizmów regulacji procesów  
wewnątrzkomórkowych

Autor: Daria Kałużyńska

Promotor: prof. dr hab. inż. Jarosław Śmieja

Promotor pomocniczy: dr inż. Anna Lalik

Gliwice, wrzesień 2023



*Składam serdeczne podziękowania moim Promotorom -  
prof. Jarosławowi Śmieji oraz dr inż. Annie Lalik za wsparcie merytoryczne  
oraz długie godziny dyskusji przy kawie  
na tematy naukowe i nie tylko.*

*Serdeczne podziękowania składam pani mgr inż. Oldze Kocikowskiej  
za nieocenioną pomoc przy powstawaniu wyników biologicznych.  
Składam również podziękowania za ogrom wsparcia i sprawienie, że siedzenie  
kilkanaście godzin dziennie w laboratorium było przyjemnością.*

*Dziękuję również wszystkim pracownikom oraz doktorantom z Centrum Biotechnologii  
za wsparcie merytoryczne i duchowe i zjedzenie tony serniczek :)*

*Ogromne podziękowanie kieruję do pracowników i  
doktorantów Katedry Inżynierii i Biologii Systemów za konstruktywną krytykę  
oraz możliwość rozwoju.*

*Pracę dedykuję mojemu Mężowi, Piotrowi, który nigdy we mnie nie zwątpił.*



# Spis treści

<b>Streszczenie</b>	<b>4</b>
<b>Summary</b>	<b>4</b>
<b>1 Wstęp</b>	<b>5</b>
1.1 Wprowadzenie . . . . .	5
1.2 Cele i tezy pracy . . . . .	6
1.3 Przewodnik po rozdziałach . . . . .	7
<b>2 Podstawy biologiczne</b>	<b>9</b>
2.1 Białka . . . . .	9
2.2 Translacja . . . . .	10
2.2.1 Rybosomy . . . . .	11
2.3 Translacja . . . . .	12
2.3.1 Inicjacja . . . . .	12
2.3.2 Elongacja . . . . .	13
2.3.3 Terminacja . . . . .	13
2.4 Rybosomy i polisomy . . . . .	14
2.5 Techniki profilowania polisomów . . . . .	14
2.5.1 Profilowanie polisomów . . . . .	15
2.5.2 Ribo-seq . . . . .	15
2.5.3 Metody oczyszczania oparte na powinowactwie do rybosomów . . . . .	16
2.6 Regulacja procesu translacji . . . . .	17
2.7 mikroRNA . . . . .	18
2.7.1 Mechanizmy represji translacji . . . . .	19

---

2.7.2	mikroRNA a polisomy . . . . .	20
2.8	Promieniowanie jonizujące . . . . .	21
2.8.1	Źródła oraz typy promieniowania jonizującego . . . . .	22
2.8.2	Efekty promieniowania . . . . .	24
2.8.3	Promieniowanie jonizujące a translacja . . . . .	25
2.8.4	Promieniowanie jonizujące a polisomy . . . . .	26
2.8.5	Promieniowanie jonizujące a mikroRNA . . . . .	26
<b>3</b>	<b>Modelowanie procesu translacji</b>	<b>27</b>
3.1	Modele oparte na ODE . . . . .	28
3.2	TASEP . . . . .	29
3.3	Sieci Petriego . . . . .	30
3.4	Inne modele . . . . .	32
<b>4</b>	<b>Metodyka badań biologicznych</b>	<b>35</b>
4.1	Hodowla Komórkowa . . . . .	36
4.2	Wirowanie i rozdział frakcji . . . . .	37
4.3	Izolacja RNA i mikroRNA . . . . .	39
4.4	Synteza cDNA . . . . .	39
4.5	qPCR . . . . .	39
4.6	Izolacja oraz oznaczenie stężenia białek . . . . .	40
4.7	Western Blot . . . . .	41
<b>5</b>	<b>Opis modelu</b>	<b>43</b>
5.1	Maszyny Stanowe . . . . .	44
5.2	Opis modelu . . . . .	45
5.2.1	Translacja . . . . .	45
5.2.2	Automat . . . . .	49
5.2.3	Wybrane mechanizmy regulacji translacji . . . . .	54
5.2.4	Tworzenie tabeli rankingowej . . . . .	56
<b>6</b>	<b>Wyniki</b>	<b>59</b>
6.1	Wyniki biologiczne . . . . .	59
6.2	Wyniki symulacji . . . . .	67

---

6.2.1	Symulacje dla „czystych” mechanizmów . . . . .	67
6.2.2	Wyniki symulacji dla białka i transkryptu p53 z regulacją przez miR-638 . . . . .	70
6.2.3	Wyniki symulacji dla białka i transkryptu PTEN z regulacją przez miR-638 . . . . .	74
<b>7</b>	<b>Dyskusja wyników</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Podsumowanie</b>	<b>85</b>
	<b>Bibliografia</b>	<b>XXV</b>
	<b>Spis skrótów i symboli</b>	<b>XXVII</b>
	<b>Spis rysunków</b>	<b>XXXIV</b>
	<b>Spis tabel</b>	<b>XXXVII</b>
	<b>Suplement</b>	<b>XXXIX</b>
	<b>Dorobek naukowy Autorki</b>	<b>LI</b>





# Streszczenie

Procesy wewnątrzkomórkowe są utrzymywane w homeostazie między innymi dzięki konserwatywnie działającym tzw. sieciom regulatorowym, które odpowiadają za prawidłowy przebieg i tempo reakcji, transport molekuł czy kontrolowanie procesów syntezy-/degradacji molekuł. Jednym z powszechniej badanych szlaków sygnałowych są szlaki związane z apoptozą. Apoptoza jest naturalnym procesem zaprogramowanej śmierci komórki, do której dochodzi w momencie jej trwałego uszkodzenia i braku możliwości powrotu do stanu pierwotnego. Jednym z najbardziej znanych i zbadanych białek tej ścieżki jest białko p53, nazywane również strażnikiem genomu. Białko to jest odpowiedzialne za zatrzymanie cyklu komórkowego w celu naprawienia DNA, a także za „podjęcie decyzji” o uruchomieniu kaskad sygnałowych prowadzących do śmierci komórkowej.

Ciąg procesów prowadzących do powstania aktywnego, biorącego czynny udział w regulacji szlaków sygnałowych białka, jest nazywany ekspresją genów. Jednym z ostatnich etapów tego procesu jest translacja, w której powstałe w etapie poprzedzającym – transkrypcji, mRNA, jest tłumaczone przez rybosomy na łańcuch aminokwasów. Następnie, w wyniku odpowiednich obróbek potranslacyjnych łańcuch jest formowany do postaci aktywnego białka. Translacja jest bardzo silnie regulowanym procesem, na który wpływa wiele czynników, zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowych. Jednym z najintensywniej badanych czynników regulujących translację jest mikroRNA – są to krótkie (o długości około 21-25 nukleotydów) niekodujące cząsteczki RNA, które głównie są zaangażowane w represję translacji tzw. białek celowanych (targetów). Ze względu na złożoność mechanizmów regulacji oraz różne „efekty” powodujące inhibicję ekspresji (np. zahamowanie inicjacji czy degradacja mRNA), wynikające z tej regulacji, dokładne działanie mikroRNA nie zostało do końca poznane.

Niniejsza praca doktorska skupia się na analizie wybranych mechanizmów regula-

cji procesu translacji. Zaproponowano model matematyczny oparty na maszynach stacjonarych, opisujący proces translacji z uwzględnieniem profilu polisomalnego (struktur, gdzie na jednej nici mRNA występuje więcej niż jeden rybosom, i która pozwala na równoległą produkcję więcej niż jednego łańcucha aminokwasów z jednej cząsteczki mRNA). Dodatkowo do modelu został wprowadzony czynnik regulujący translację w postaci mikroRNA oraz promieniowania jonizującego (promieniowania X). Symulacje zostały przeprowadzone w oparciu o autorskie wyniki biologiczne, w których dla ludzkich komórek nowotworu okrężnicy (HCT116) zostały wyznaczone poziomy wybranych białek, transkryptów oraz mikroRNA w warunkach kontrolnych oraz w czasach 4 i 12 godzin od napromieniowania. Ponadto w badaniach wyznaczono profil polisomalny (rozkład rybosomów) w obrębie konkretnego transkryptu i mikroRNA. Wszystkie eksperymenty oparto na białkach szlaku sygnałowego apoptozy (p53 i PTEN), które są dobrze opisane w literaturze, jako białka biorące aktywny udział w procesie naprawczym DNA (uszkodzonym np. w wyniku promieniowania). MikroRNA dobrano na podstawie doniesień literaturowych, które jednoznacznie wskazywały na bezpośrednie oddziaływanie miRNA na wybrane białka oraz zahamowanie ich ekspresji. Zaproponowany model miał na celu sprawdzenie, czy spośród wybranych mechanizmów regulacji translacji z udziałem mikroRNA jest mechanizmem dominującym oraz czy ten mechanizm po napromieniowaniu komórek może ulec zmianie. Ze względu na ograniczenia techniczne oraz koszty eksperymentów badających działanie mikroRNA, model ten może okazać się wartościowy z punktu widzenia planowania eksperymentów.

# Summary

Intracellular processes are maintained in homeostasis, in part, through conservatively acting signal pathways that govern the proper progression and pace of reactions, molecule transport, and the control of molecule synthesis and degradation. One of the commonly studied signaling pathways involves apoptosis. Apoptosis is a natural process of programmed cell death that occurs when a cell is irreparably damaged and cannot return to its original state. One of the most well-known and extensively studied proteins in this pathway is p53, also known as the guardian of the genome. This protein is responsible for halting the cell cycle to repair DNA and, if necessary, making the decision to initiate signaling cascades leading to cell death.

The series of processes leading to the creation of an active protein actively involved in regulating signaling pathways is called gene expression. One of the final stages of this process is translation, in which the mRNA generated in the preceding transcription phase is translated by ribosomes into a chain of amino acids. Subsequently, through appropriate post-translational modifications, this chain is shaped into an active protein. Translation is a highly regulated process influenced by numerous factors, both intracellular and extracellular. One of the most intensively studied factors regulating translation is microRNA (miRNA). MiRNAs are short (approximately 21-25 nucleotides long) non-coding RNA molecules primarily involved in the repression of translation of target proteins. Due to the complexity of regulatory mechanisms and various effects leading to expression inhibition (such as initiation inhibition or mRNA degradation) resulting from this regulation, the precise workings of miRNAs have not been fully elucidated.

This doctoral thesis focuses on analyzing selected mechanisms that regulate the translation process. A mathematical model based on state machines has been proposed to describe the translation process, taking into account the polysomal profile (structures

where more than one ribosome is present on a single mRNA strand, allowing for the parallel production of more than one amino acid chain from one mRNA molecule). Additionally, a factor regulating translation, in the form of miRNA, and ionizing radiation (X-rays), have been introduced into the model. Simulations were conducted based on original biological results in which the levels of selected proteins, transcripts, and miRNAs were determined in human colon cancer cells (HCT116) under control conditions and at 4 and 12 hours post-irradiation. Furthermore, polysomal profiles (ribosome distribution) within specific transcripts and miRNAs were determined in the study. All experiments were based on proteins involved in the apoptosis signaling pathway (p53 and PTEN), which are well-described in the literature as proteins actively participating in DNA repair processes (e.g., following radiation-induced damage). MiRNAs were selected based on literature reports that clearly indicated their direct interaction with specific proteins and their role in inhibiting their expression.

The proposed model aimed to investigate whether miRNA-mediated translation regulation is a dominant mechanism among the selected translation regulation mechanisms and whether this mechanism may change following cell irradiation. Due to technical limitations and the costs of experiments studying miRNA activity, this model may prove valuable in experiment planning.

**Słowa kluczowe:** modelowanie translacji, maszyny stanu, mikroRNA, polisomy, promieniowanie

# Rozdział 1

## Wstęp

### 1.1 Wprowadzenie

Procesy wewnątrzkomórkowe stanowią sieć skomplikowanych mechanizmów, które zapewniają prawidłowe funkcjonowanie żywych komórek [77]. Procesy wewnątrzkomórkowe to zbiór zróżnicowanych aktywności biologicznych zachodzących w obrębie komórki. Obejmują one wszystkie procesy życiowe zachodzące w komórce: od ekspresji informacji genetycznej do produkcji białek, szlaków sygnałowych, transportu cząsteczek, produkcji energii czy podziały komórkowe [80]. W centrum tych procesów leży zdolność komórki do reagowania na bodźce zarówno wewnętrzne, jak i zewnętrzne, w celu dostosowania się do zmieniającego się otoczenia i utrzymania homeostazy. Aby ją zapewnić, wszystkie procesy wewnątrzkomórkowe w mniejszym lub większym stopniu muszą być ze sobą powiązane i współgrać ze sobą.

Do najważniejszych procesów wewnątrzkomórkowych, decydujących o funkcjonowaniu komórki, należy ekspresja genów. Odgrywa ona niezwykle ważną rolę na różnych etapach życia komórki. Ekspresja genów odnosi się do szeregu procesów, w których informacja zawarta w DNA zostaje przepisana na cząsteczki RNA (proces transkrypcji) a następnie informacja z zawarta w cząsteczkach mRNA zostaje przekształcona w funkcjonalne produkty, czyli białka (proces translacji). Na poziomie transkrypcji ekspresja genów jest kontrolowana m.in. przez czynniki transkrypcyjne, znaczniki epigenetyczne czy zmiany struktury chromatyny [112, 81]. Przetwarzanie (np. splicing, poliadenylacja i modyfikacje), transport i degradacja mRNA są regulowane przez białka wiążące RNA i

niekodujące RNA [9, 56].

Sama translacja białek jest złożonym, wieloetapowym procesem, który podlega rozległej regulacji na poziomach inicjacji, elongacji, lokalizacji i składu rybosomów [157, 32]. Poziom białek w komórkach zależy również od, ściśle regulowanej degradacji białek.

Historycznie, większość badań dotyczących zmian ekspresji genów skupiała się na zmianach poziomów mRNA odzwierciedlających zmiany w transkrypcji i/lub stabilności mRNA [139, 178, 128]. Jednak wiele badań sugeruje, że nawet w warunkach kontrolnych, poziomy białek nie zawsze koreluje z ilością mRNA [171, 38, 170, 132], chociaż znalazły się również głosy sprzeciwu i kwestionowano te wyniki [92, 93]. Translacja mRNA odgrywa znaczącą rolę w kształtowaniu proteomów i w reakcjach na zaburzenia homeostazy w środowisku komórkowym, w tym wahań w poziomach tlenu, składników odżywczych i pojawienia się w układzie różnych czynników stresowych [43, 47, 187]. Ponadto, translacja mRNA jest również bardzo kosztowna energetycznie [17].

Dane literaturowe pokazują, że translacja i metabolizm komórki są silnie ze sobą związane [113]. Dlatego nie jest zaskakujące, że zaburzona translacja mRNA jest cechą wspólną chorób, w których programy metaboliczne są zakłócone, jak np. w chorobach nowotworowych [157]. Wykazano też na modelach przedklinicznych, że wiele składników maszyny translacyjnej może stanowić cele terapeutyczne w leczeniu raka [11, 22, 87, 181, 157].

## 1.2 Cele i tezy pracy

Głównym celem prezentowanej rozprawy jest budowa oraz analiza modelu matematycznego procesu translacji pojedynczego transkryptu z uwzględnieniem profili polisomalnych. Model jest oparty zarówno o autorskie dane eksperymentalne jak i o dane literaturowe. Wykonane badania można podzielić na kilka zadań:

1. Badania eksperymentalne oraz analiza pozyskanych danych, pozwalające na wyznaczenie profili polisomalnych badanych mRNA oraz mikroRNA.
2. Badania eksperymentalne oraz analiza danych, pozwalająca na określenie całkowitych poziomów ekspresji badanych białek, transkryptów oraz mikroRNA.

3. Zbudowanie podstawowego modelu translacji w oparciu o profil polisomalny.
4. Modyfikacja modelu o elementy regulujące proces translacji (IR, mikroRNA).
5. Analiza oraz interpretacja wyników biologicznych.
6. Analiza oraz interpretacja wyników symulacji.

Przeprowadzone analizy symulacyjne oraz zgromadzone dane eksperymentalne miały zweryfikować prawdziwość następujących tez:

1. Modele hybrydowe wykorzystujące maszyny stanowe są skutecznym narzędziem pozwalającym na postawienie i wstępną weryfikację hipotez dotyczących biochemicznych mechanizmów regulacyjnych.
2. Regulacja ekspresji białek, zależna od mikroRNA wykorzystuje równolegle wiele mechanizmów.
3. Mechanizm regulacji translacji z udziałem mikroRNA zależy od konkretnego mRNA i mikroRNA.

## 1.3 Przewodnik po rozdziałach

Niniejsza rozprawa doktorska składa się z ośmiu rozdziałów oraz bibliografii.

W rozdziale pierwszym przedstawione zostały cele i tezy pracy doktorskiej.

Rozdział drugi przedstawia biologiczne podstawy teoretyczne, mające na celu pomoc w zrozumieniu analizowanego zagadnienia. Krótko przedstawiono proces ekspresji genów oraz wyjaśniono istotność procesu translacji w regulacji ekspresji genów. Następnie pokrótce opisano, czym jest translacja i przedstawiono główne etapy tego procesu. W rozdziale drugim, czytelnik zapoznaje się również z pojęciem polisomów oraz technikami badania tych struktur. Kolejną częścią tego rozdziału jest przedstawienie czynników oraz molekuł, odpowiadających za regulacje procesy translacji; skupiono się głównie na badanych w Rozprawie czynnikach – promieniowaniu jonizującym oraz mikroRNA. Przedstawiono zależności i powiązania pomiędzy mikroRNA, promieniowaniem oraz polisomami i procesem translacji. W tym rozdziale zawarto również przegląd istniejących modeli translacji z uwzględnieniem polisomów w układzie.

W rozdziale trzecim przedstawiono przegląd istniejących modeli translacji z uwzględnieniem polisomów w układzie.

Rozdział czwarty przedstawia metodykę wykonanych badań biologicznych. Zostały opisane wszystkie wykorzystane w badaniach techniki oraz procedury i warunki, w jakich eksperymenty były prowadzone.

Rozdział piąty zawiera pełny opis modelu, wraz z wprowadzeniem czytelnika w tematykę maszyn stanowych. Przedstawiono algorytm zaproponowanego modelu oraz niezbędne założenia i ograniczenia. Wyszczególniono podstawowy model translacji, a także jego modyfikacje wynikające z wprowadzenia elementów regulujących.

W rozdziale szóstym przedstawiono wyniki zarówno biologiczne jak i symulacji. Porównano poziomy badanych molekuł oraz udziały frakcji polisomalnych. Porównano także wyniki biologiczne do wyników z symulacji modelu i zapisano obserwacje.

Rozdział siódmy zawiera szczegółową dyskusję uzyskanych wyników. W dyskusji porównano analizę i wyniki opisane w rozdziale szóstym oraz odniesiono te wyniki do doniesień literaturowych.

Ostatni rozdział pracy zawiera krótkie podsumowanie uzyskanych wyników i sformułowanie wniosków wyciągniętych na podstawie badań przeprowadzonych w ramach niniejszej Rozprawy.



# Rozdział 2

## Podstawy biologiczne

### 2.1 Białka

Białka są produktami końcowymi procesu translacji. Jako tzw. „konie pociągowe” komórki, białka składają się na elementy strukturalne i motoryczne w komórce i służą jako katalizatory praktycznie każdej reakcji biochemicznej zachodzącej w organizmach żywych. Każdy gen w komórkowym DNA zawiera „przepis” na powstanie konkretnego białka.

Podstawowymi składnikami budulcowymi białek są aminokwasy. Są to małe cząsteczki, składające się z centralnego atomu węgla połączonego z grupą aminową, grupą karboksylową, atomem wodoru i zmiennym łańcuchem bocznym. Aminokwasy są połączone ze sobą wiązaniami peptydowymi, tworząc długie łańcuchy [1, 68, 84].

Istnieje dwadzieścia różnych aminokwasów, które tworzą białka. Sekwencja aminokwasowa białka determinuje proces jego fałdowania oraz tworzenie wiązań wewnątrzcząsteczkowych w łańcuchu aminokwasowym, co ostatecznie nadaje białku unikalną trójwymiarową strukturę [75]. Wiązania wodorowe między grupami aminowymi i karboksylowymi w sąsiednich regionach łańcucha białkowego mogą prowadzić do powstania określonych wzorców fałdowania. Należą do nich  $\alpha$ -helisy i  $\beta$ -kartki, tworzące drugorzędową strukturę białek. Większość białek zawiera wiele helis i katek, a także inne, mniej powszechne wzorce. Trzeciorzędowa struktura białka odnosi się do formacji i fałdowania w pojedynczym łańcuchu aminokwasów, nazywanym polipeptydem. Na koniec, czwartorzędowa struktura białka dotyczy makrocząsteczek, które składają się z

wielu łańcuchów lub podjednostek polipeptydowych. Różne struktury białek wpływają na ich właściwości chemiczne i zdolność do interakcji z innymi cząsteczkami, co jest istotne dla ich funkcji biologicznych [30].

Białka, jako funkcjonalne molekuly, stanowią kluczowe elementy wszystkich błon komórkowych i organelli. Wśród swoich wielu funkcji, białka błonowe pełnią rolę receptorów, równoważą gospodarkę hormonalną, mogą również pełnić funkcję kanałów transportowych w błonach komórkowych, przepuszczając specyficznie substancje, które ze względu na skład i rozmiar, nie były w stanie dostać się przez błony (np. akwaporyny, które umożliwiają transport wody z i do komórki, lub kanały jonowe, takie jak kanały sodowe czy potasowe, które przepuszczają wyłącznie specyficzne dla danego kanału jony).

Bardzo ważną funkcją białek jest utrzymanie kształtu i struktury komórki – tworzą w komórkach tzw. cytoszkielec, który jest zbudowany z białek o specyficznej strukturze: mikrotubuli, mikrofilamentów i włókien pośrednich. Białka biorą również bardzo istotną rolę w podziale komórkowym, tworząc włókna wrzecionowate, które dzielą chromosomy na dwie połowy.

Poza wyżej wymienionymi funkcjami, białka biorą również udział w transporcie wewnątrzkomórkowym, transporcie tlenu (hemoglobina i mioglobina), transporcie różnych substancji we krwi (m. in. albumina), skurczach mięśni (aktyna, miozyna), w odpowiedzi immunologicznej, trawieniu złożonych substancji na prostsze (przeważnie enzymy trawienne takie jak amylaza).

Białka również mogą pełnić funkcje magazynujące; przechowują one w swojej strukturze tysiące aminokwasów, które są uwalniane z białek w przypadku pojawienia się niedoborów aminokwasów, bądź zwiększonego ich zapotrzebowania. Białka również pełnią funkcję regulatorową w komórkach i kontrolują ekspresję genów (np. czynniki transkrypcyjne) oraz biorą czynny udział w kaskadach szlaków sygnałowych [1, 84, 194].

## 2.2 Translacja

Proces translacji, będący jednym z ostatnich etapów mechanizmu ekspresji genów, jest odpowiedzialny za przekształcenie informacji zawartej w łańcuchu matrycowego mRNA (mRNA) na sekwencję aminokwasów. mRNA jest jednoniciowym RNA powstającym w wyniku transkrypcji. Dojrzałe mRNA składa się z kilku segmentów, zaczynając

od końca 5': czapeczki, niekodującego końca 5' UTR, sekwencji kodującej białko, niekodującego końca 3' UTR i łańcucha poli A [105, 140]. Każdy z tych segmentów pełni ważną rolę w procesie translacji. Czapeczka, będąca zmodyfikowaną guaniną dodawaną na początku łańcucha mRNA, oraz łańcuch poli A (ciąg kilkunastu nukleotydów - adenin), poza pełnieniem istotnej roli w procesie inicjacji translacji, pełni również funkcje ochronne dla cząsteczki mRNA i ułatwia jej transport z jądra do cytoplazmy [73, 188]. Końce 3' i 5' UTR, chociaż nie podlegają bezpośrednio translacji, odgrywa istotną rolę regulacyjną ze względu na swoją zdolność do tworzenia struktur drugorzędowych, wynikającą z wysokiej zawartości nukleotydów GC [90]. Struktura ta chroni mRNA przed degradacją enzymatyczną oraz umożliwia skuteczne wiązanie rybosomów, co przyspiesza proces translacji. Ponadto, łańcuch poli A pełni również rolę w oddzieleniu mRNA od matrycy DNA po zakończeniu transkrypcji [153]. Struktury drugorzędowe, które mogą się tworzyć w tym regionie, mogą wpływać na dostępność miejsca inicjacji translacji lub na interakcje z czynnikami regulacyjnymi, co ma istotny wpływ na intensywność i szybkość translacji danego mRNA [90].

### 2.2.1 Rybosomy

Rybosomy są to duże kompleksy znajdujące się w komórce, złożone z białek oraz cząsteczek rRNA. Rybosom pełni funkcję maszyny wykonawczej w procesie translacji - odczytuje z mRNA trójki nukleotydów (kodony) i w zależności od odczytanego kodonu, wiąże odpowiedni aminokwas, wydłużając w ten sposób łańcuch peptydowy.

Rybosomy są kompleksami białek rybosomalnych i rRNA (rybosomalnego RNA), składającymi się z dwóch podjednostek - małej i dużej - o stałych sedymentacji równych odpowiednio 40S i 60S [44]. Funkcją małej podjednostki rybosomalnej jest dopasowanie tRNA (transportujące RNA) do odpowiedniego kodonu na mRNA. Natomiast rolą dużej podjednostki jest kataliza tworzenia wiązań peptydowych łączących aminokwasy w łańcuch polipeptydowy. Podjednostki rybosomu łączą się ze sobą przy końcu 5' mRNA, gdzie rozpoczyna się translacja (szczegółowy opis translacji został przedstawiony poniżej w rozdziale 2.3).

Rybosomy niezwykle wydajnie koordynują wszystkie etapy elongacji poprzez ustalony system przyłączania się tRNA. W małej podjednostce rybosomu można wyszczególnić trzy miejsca wiązania dla cząsteczek tRNA: miejsce A, miejsce P oraz miejsce

E, gdzie każde z tych miejsc odpowiada za inny fragment procesu elongacji. Miejsce A (Aminoacylo-tRNA) pomaga przyłączyć się cząsteczce tRNA do odpowiedniego miejsca na mRNA oraz przyłączyć przenoszony aminokwas do wydłużanego łańcucha, który jest przyłączony do tRNA, znajdującego się w miejscu P. Miejsce P (Peptydylo-tRNA) „trzyma” tRNA wraz z wydłużającym się polipeptydem i przejmuje kolejny aminokwas z miejsca A. Miejsce E natomiast uwalnia tRNA z powrotem do cytoplazmy (*Exit*).

tRNA jest to grupa RNA o długości około 80 nukleotydów, która przenosi cząsteczkę aminokwasu do miejsca, gdzie jest on kodowany. Na końcu 3' tRNA znajduje się kodowany aminokwas, a na przeciwległym końcu cząsteczki sekwencja antykodonowa. W obszarze, gdzie znajduje się antykodon, tRNA wiąże się kowalencyjnie z aminokwasem za pośrednictwem grupy enzymów, nazywanymi syntetazami aminoacylo-tRNA i tym samym powstaje cząsteczka aminoacylo-tRNA [5], która odpowiedzialna jest za dostarczenie aminokwasu do rybosomu. Następnie, poprzez wiązania wodorowe, kodon wiąże się komplementarnie z antykodonem tRNA, a aminokwas przyłączony do tRNA łączy się z łańcuchem peptydowym.

## 2.3 Translacja

### 2.3.1 Inicjacja

Proces inicjacji translacji rozpoczyna się od związania małej podjednostki rybosomu (40S u eukariotów) z cząsteczką mRNA [146]. Ta interakcja jest ułatwiona dzięki rozpoznaniu struktury czapeczki 5' na mRNA i wiązaniu czynników inicjujących. Mała podjednostka rybosomu skanuje mRNA w kierunku od 5' do 3', aż dotrze do kodonu start, którym zazwyczaj jest AUG kodujący metioninę [11, 151]. tRNA z inicjującym aminokwasem przyłącza się od razu do miejsca P rybosomu wraz z białkami inicjującymi translację (tzw. czynnikami inicjacji translacji) [104]. Następnie wiąże się do końca 5' mRNA i rozpoczyna skanowanie w stronę końca 3' aż do napotkania sekwencji komplementarnej do antykodonu przenoszonego przez tRNA metioniny. Wtedy niektóre białka inicjujące odłączają się od małej podjednostki rybosomu, aby umożliwić przyłączenie się dużej podjednostki [57, 66]. Inicjację kończy wprowadzenie do miejsca A rybosomu tRNA niosącego kolejny aminokwas.

### 2.3.2 Elongacja

Elongacja przebiega wraz z przesuwaniem pojedynczych kodonów wewnątrz rybosomu (inaczej nazywanym translokacją). Podczas translokacji, tRNA z aminokwasem wchodzi w miejsce A rybosomu, następnie przesuwa się do miejsca P, a następnie do miejsca E, w celu uwolnienia tRNA z powrotem do cytoplazmy [28, 117]. Ruchy rybosomalne są indukowane przez zmiany konformacyjne, które przesuują rybosom o trzy zasady w kierunku końca 3' mRNA. Wiązania peptydowe tworzą się między grupą aminową aminokwasu przyłączonej do tRNA w miejscu A, a grupą karboksylową aminokwasu przyłączonej do tRNA w miejscu P.

Tworzenie każdego wiązania peptydowego jest katalizowane przez transferazę peptydylową, która jest zintegrowana z podjednostką rybosomalną 40S i łączy aminokwas z miejsca P do wydłużanego łańcucha polipeptydowego. Po utworzeniu wiązania peptydowego, rybosom ponownie przesuwa się lub translokuje, co powoduje, że tRNA zajmuje miejsce E w rybosomie [28]. tRNA jest następnie uwalniane do cytoplazmy, w celu pobrania kolejnego aminokwasu. Ponadto miejsce A jest teraz puste i gotowe na przyjęcie tRNA dla następnego kodonu. Proces ten powtarza się, aż wszystkie kodony w mRNA zostaną odczytane przez cząsteczki tRNA, a aminokwasy przyłączone do tRNA zostaną połączone razem w rosnącym łańcuchu polipeptydowym w odpowiedniej kolejności.

### 2.3.3 Terminacja

Terminacja translacji jest ostatnim etapem syntezy białka, w którym rybosom rozpoznaje i uwalnia nowo zsyntetyzowany łańcuch polipeptydowy z matrycy mRNA. Obejmuje rozpoznawanie kodonu stop, hydrolizę wiązania peptydylo-tRNA i dysocjację rybosomu od mRNA. Proces terminacji rozpoczyna się, gdy rybosom napotka kodon stop (UAA, UAG lub UGA) [1, 54]. W przeciwieństwie do zwykłych kodonów, które określają aminokwas, kodony stop nie mają odpowiednich tRNA przenoszących aminokwasy. Zamiast tego są rozpoznawane przez czynniki uwalniające (RF - release factor), które są wyspecjalizowanymi białkami promującymi proces terminacji [54]. Wiązanie czynnika uwalniającego z kodonem stop uruchamia kaskadę zdarzeń. Czynniki uwalniające oddziałują z centrum transferazy peptydylowej rybosomu, prowadząc do hydrolizy wiązania estrowego między tRNA w miejscu P a powstającym łańcuchem polipeptydowym [39, 83]. Ta hydroliza uwalnia gotowy polipeptyd z tRNA, umożliwiając mu złożenie

się w funkcjonalną konformację. Po rozszczepieniu wiązania peptydylo-tRNA rybosom przechodzi zmianę konformacyjną, ułatwioną przez RF, co prowadzi do dysocjacji podjednostek rybosomu i uwolnienia matrycy mRNA [58, 67]. Podjednostki rybosomu są wtedy gotowe do zainicjowania translacji na nowej cząsteczce mRNA.

## 2.4 Rybosomy i polisomy

Jak wspomniano w poprzednich podrozdziałach, główną jednostką wykonawczą w procesie tłumaczenia mRNA jest rybosom. Rybosom jest dużym kompleksem rybonukleoproteinowym, który składa się z czterech rybosomalnych RNA (rRNA) i 79 białek rybosomalnych (RP), które są wspólne dla dwóch podjednostek określanych jako duża (60S) i mała (40S) podjednostka rybosomalna [183]. Podczas translacji kompleks mRNA-rybosom może stworzyć struktury, zwane „polisomami”

Polisomy zostały odkryte już w latach sześćdziesiątych XX wieku [137, 138]. Polisomy to kompleksy występujące w komórce zawierające pojedynczą nić mRNA z przyłączonym do niej więcej niż jednym rybosomem. W przypadku polisomów, kilka rybosomów może równocześnie przesuwać się wzdłuż jednej cząsteczki mRNA i tłumaczyć informacje genetyczne na białka [119]. To oznacza, że z jednej cząsteczki mRNA może być syntetyzowanych wiele kopii tego samego białka jednocześnie, co zwiększa efektywność procesu translacji. Polisomy są ważnym mechanizmem regulacyjnym procesu translacji.

Poziom polisomów na danej cząsteczce mRNA może zmieniać się w odpowiedzi na różne bodźce i sygnały komórkowe. Zmiany te mogą wpływać na tempo produkcji białek i dostępność mRNA dla rybosomów. Regulacja poziomu polisomów może mieć istotny wpływ na ekspresję genów i jest jednym ze sposobów, w jaki komórka dostosowuje się do zmieniających się warunków środowiska.

## 2.5 Techniki profilowania polisomów

Techniki profilowania rybosomów, opracowane w latach sześćdziesiątych, są stosowane do dnia dzisiejszego. Oczywiście techniki te uległy pewnym modyfikacjom, na które pozwolił rozwój technologii oraz obszerniejsza wiedza na temat tego zagadnienia.

Pozwoliło to na dokładniejsze analizy translatomu oraz większą rozdzielczość wyników [79].

Obecnie w badaniach wykorzystuje się trzy główne techniki analizy translatomu: profilowanie polisomów, profilowanie rybosomów oraz frakcjonowanie z wykorzystaniem spektrometrii masowej.

### 2.5.1 Profilowanie polisomów

Najpopularniejszą techniką badań translatomu jest wirowanie w gradiencie sacharozy. Podczas wirowania, struktury rozdzielane są ze względu na gęstość, co umożliwia odseparowanie od siebie wolnego (nie związanego z rybosomami) mRNA, wolnych podjednostek rybosomów, monosomów (mRNA związane z jednym rybosomem) i polisomów (mRNA związane z więcej niż trzema rybosomami).

Do rozdziału dochodzi poprzez wirowanie lizatu białkowego w liniowym gradiencie sacharozy (zwykle o zakresie stężeń od 10% do 50%). Wirowanie przeprowadza się w obecności cykloheksimidu, który jest inhibitorem elongacji. Po wirowaniu, roztwór jest grawitacyjnie rozdzielany na niewielkie próbki (im mniejsze, tym rozdzielczość pomiarów jest większa), a następnie, na podstawie pomiarów stężenia RNA, próbki są łączone we frakcje (najczęściej jest to od kilku do kilkunastu frakcji - nie jest to w żaden sposób ustandaryzowane). RNA z każdej frakcji jest izolowane i analizowana jest zawartość danego mRNA w danej frakcji polisomalnej. Zwykle wykonuje się to poprzez wykonanie odwrotnej transkrypcji, po której następuje ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (RT-qPCR) lub przeprowadza się sekwencjonowanie RNA (RNA-seq) dla RNA wyizolowanego z każdej frakcji.

Alternatywnie można przeprowadzić profilowanie rybosomów (Ribo-seq) w celu uzyskania informacji o wysokiej rozdzielczości na temat zajętości rybosomów na mRNA [128].

### 2.5.2 Ribo-seq

Ribo-seq, znany również jako profilowanie rybosomów lub śledzenie rybosomów, jest coraz popularniejszą techniką stosowaną do badania translacji w skali całego genomu. Zapewnia przechwyt aktywnych translacyjnie mRNA i pozwala uzyskać wgląd

w dynamikę syntezy białek w komórkach [49, 136]. Kluczową zasadą Ribo-seq jest selektywne wychwytywanie i sekwencjonowanie fragmentów mRNA chronionych przez rybosomy.

Technika Ribo-seq obejmuje kilka kroków. Najpierw komórki lub tkanki traktuje się inhibitorem elongacji translacji, takim jak cykloheksimid lub harringtonina, w celu „zamrożenia” rybosomów na mRNA. Zapewnia to stabilizację kompleksów rybosom-mRNA i zapobiega przesunięciu rybosomów wzdłuż mRNA. Komórki są następnie lizowane, a kompleksy rybosom-mRNA są izolowane przez trawienie nukleazą lub fragmentację chemiczną [131]. Następnie fragmenty mRNA chronione rybosomami są odzyskiwane i przekształcane w bibliotekę sekwencjonowania. Zazwyczaj RF są selekcjonowane pod względem wielkości w celu uzyskania fragmentów o określonym zakresie długości, który odpowiada rozmiarowi rybosomów pokrywających mRNA. Biblioteka jest poddawana wysokoprzepustowemu sekwencjonowaniu przy użyciu technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS), które generują miliony odczytów krótkich sekwencji [49, 115].

Analiza danych w Ribo-seq obejmuje kilka etapów obliczeniowych, w tym mapowanie odczytu, normalizację i identyfikację regionów podlegających translacji. Zmapowane odczyty są porównywane z transkryptomem z adnotacjami w celu przypisania odczytów do określonych genów i obliczenia gęstości odczytu wzdłuż mRNA. Gęstości odczytu można następnie wykorzystać do wnioskowania o wydajności translacji, identyfikacji przetłumaczonych otwartych ramek odczytu (ORF) i analizy regulacji translacji w różnych warunkach lub w różnych typach komórek.

### **2.5.3 Metody oczyszczania oparte na powinowactwie do rybosomów**

Aby przezwyciężyć trudności z izolacją czystych populacji komórek (np. z mózgu, gdzie różnorodność komórek jest duża) do badania ekspresji genów, stosuje się metody oczyszczania oparte na powinowactwie do rybosomów. Metody oczyszczania oparte na powinowactwie do rybosomów (RAP) lub powinowactwie do rybosomów ulegających translacji (TRAP). Te metody stają się coraz bardziej popularne jako narzędzia umożliwiające monitorowanie ekspresji genów w określonych typach komórek, takich jak neurony i komórki macierzyste [53].



W tej technice, wprowadza się genetyczne modyfikacje do komórek lub organizmów, które powodują ekspresję znakowanych białek rybosomalnych. Najczęściej jest to znakowanie dużej (60S) podjednostki rybosomu za pomocą sekwencji takiej jak EGFP-L10A [53, 79]. Istotne jest, że ekspresja tych znakowanych białek rybosomalnych może być kontrolowana przez specyficzne dla tkanki promotory, takie jak system Gal4-UAS w przypadku muchy owocowej *Drosophila melanogaster* lub system Cre-lox u myszy. Następnie pobiera się tkankę, a znakowane rybosomy są odzyskiwane poprzez selekcję opartą na powinowactwie, umożliwiając wyłącznie izolację tych rybosomów, które są aktywne w badanych komórkach. W kolejnym kroku izoluje się RNA z odzyskanych rybosomów, a następnie dokonuje się jego ilościowej analizy za pomocą technik takich jak mikromacierze lub sekwencjonowanie RNA (RNA-seq). Ważne jest, że ze względu na wyłapywanie całych rybosomów, w tym monosomów i polisomów, metody RAP/TRAP nie dostarczają wysokorozdzielczych map stanu translacji mRNA, tak jak w przypadku profilowania polisomalnego.

## 2.6 Regulacja procesu translacji

Synteza białek jest niezbędnym procesem w regulacji ekspresji genów i jest kluczowym elementem w jego kontroli. Regulacja translacji odgrywa istotną rolę w większości procesów zachodzących w komórce i ma kluczowe znaczenie dla utrzymania homeostazy w komórce i organizmie. Szybkość syntezy białka na ogół jest proporcjonalna do stężenia i wydajności translacyjnej jego mRNA. Kontrola translacji reguluje wydajność mRNA, a tym samym odgrywa ważną rolę w regulacji ekspresji wielu genów, które odpowiadają na sygnały endogenne lub egzogenne, takie jak dostarczanie składników odżywczych, hormony lub stres.

Ponieważ zdecydowana większość eukariotycznych mRNA ma dość długi okres półtrwania (>2 h) [133], szybka regulacja poziomów białek w komórkach musi być osiągnięta poprzez kontrolowanie wydajności translacji mRNA i szybkości degradacji białek. We wczesnych stadiach infekcji wirusowej oraz w komórkach pozbawionych aktywnej transkrypcji, takich jak oocyty i retikulocyty, kontrola translacji jest często jedynym mechanizmem regulującym syntezę białek. Co więcej, synteza białek zużywa dużą część zasobów energetycznych w komórkach, szczególnie takich, które charakteryzują

się krótkim cyklem komórkowym. Ponieważ synteza białek jest ściśle zintegrowana z metabolizmem komórkowym, aberracje w jej regulacji przyczyniają się do wielu stanów chorobowych.

## 2.7 mikroRNA

Odkrycie niekodujących RNA (ncRNA) zmieniło sposób, w jaki patrzymy na ludzki genom i skłoniło świat naukowy do scharakteryzowania różnych typów ncRNA transkrybowanych w ludzkich komórkach. Chociaż nie ma jasnego rozgraniczenia klas ncRNA, są one zwykle klasyfikowane, zgodnie z ich długością nukleotydów, w trzech głównych grupach: krótkie ncRNA, średniej wielkości ncRNA i długie ncRNA. Wśród krótkich ncRNA możemy wyróżnić mikroRNA i RNA oddziałujące z piwi (piRNA), odpowiednio o długości 19-25 par zasad (bp) i 26-31 bp. mikroRNA biorą udział w regulacji ekspresji genów na poziomie translacji [102, 106], podczas gdy piRNA biorą udział w metylacji DNA i represji transpozonów [86, 179]. Małe jąderkowe RNA (60-300 bp) są częścią średniej wielkości RNA i działają jako przewodniki dla modyfikacji rRNA [27]. RNA związane z promotorem (22-200 bp) należą do tej samej grupy, ale ich funkcja jest niejasna. Wreszcie, długie niekodujące RNA (lncRNA) obejmują wszystkie ncRNA dłuższe niż 200 nukleotydów i obejmują największą część niekodującego transkryptomu [103]. lncRNA biorą udział w kilku procesach biologicznych i patologicznych, takich jak imprinting genomowy, regulacja telomerów, inaktywacja chromosomu X, rozwój, pluripotentja komórek macierzystych, regulacja immunologiczna, progresja nowotworu i potencjał przerzutowy [42]. Znaczenie niekodującego transkryptomu w zrozumieniu chorób człowieka podkreśla duża liczba ncRNA, których ekspresja jest zaburzona w raku, chorobach neurologicznych i serca lub zaburzeniach odporności.

mikroRNA to małe niekodujące RNA o średniej długości 22 nukleotydów. Większość mikroRNA jest przepisywana z sekwencji DNA na pierwotne mikroRNA (pri-mikroRNA) i przetwarzana na prekursorowe mikroRNA (pre-mikroRNA) i dojrzałe mikroRNA [19, 121]. W większości przypadków, mikroRNA oddziałują z 3' UTR docelowych mRNA, aby stłumić ekspresję genów [50]. Jednak opisano również interakcję mikroRNA z innymi regionami, w tym 5' UTR, sekwencją kodującą i promotorami genów [16, 37, 61, 64, 168, 189, 196]. Ponadto wykazano, że mikroRNA mogą również aktywowo-

wać ekspresję genów w pewnych warunkach [74, 123, 168, 169]. Wciąż trwają dyskusje na temat mechanizmu działania mikroRNA.

W literaturze wyszczególnia się dwie główne ścieżki represji genów przez mikroRNA - na poziomie translacji oraz na poziomie stabilności mRNA. Wyniki eksperymentalne dowodzą, że częściej dochodzi do regulacji na poziomie translacji, gdzie regulowane są takie mechanizmy, jak elongacja, inicjacja translacji, degradacja polipeptydu, czy utrzymanie rybosomu na mRNA. Dużo rzadziej się spotyka represję na poziomie stabilności mRNA, gdzie może dojść do sekwestracji celowanego mRNA w tzw. P-bodies, bądź do degradacji mRNA [127, 182].

### 2.7.1 Mechanizmy represji translacji

W literaturze opisano bardzo obszernie skutki represji translacji w wyniku oddziaływania mikroRNA [62, 95]. Oczywiście wiadomo, że wynikiem jest zmniejszona produkcja białek, jednak na pytanie, w wyniku którego mechanizmu do tego doszło, nie ma jednoznacznych, eksperymentalnie potwierdzonych odpowiedzi. Jako mechanizm rozumiemy tu etap procesu translacji, który został zatrzymany bądź spowolniony. W pracy Morozova et al [114] wskazano dziewięć mechanizmów, na które może wpływać mikroRNA (Tabela 2.1).

Tablica 2.1: Proponowane mechanizmy działania mikroRNA. Na podstawie [114]

Lp.	Nazwa mechanizmu	Odnosnik literaturowy
1.	Inhibicja czapeczki	[35, 130]
2.	Zahamowanie przyłączenia się podjednostki 60S rybosomu	[146, 175]
3.	Zahamowanie elongacji translacji	[98, 127]
4.	Przedwczesne odłączenie się rybosomów	[55, 127]
5.	Kotranslacyjna degradacja białka	[98, 120, 129, 174]
6.	Sekwestracja w P-ciałkach	[34, 125, 129]
7.	Degradacja mRNA	[6, 35, 49, 55]
8.	Cięcie mRNA	[76, 97]
9.	Reorganizacja chromatyny za pośrednictwem mikroRNA	[2, 78]

Tabela 2.1 jednoznacznie wskazuje na różnorodność w regulacji translacji. Nie zostało jeszcze zbadane, czy istniejące mechanizmy są ze sobą powiązane, ani czy mogą ze sobą współdziałać.

Rozważając mechanizmy represji genowej, istnieje wiele czynników i procesów, które mogą odgrywać rolę w tym procesie. Mechanizmy związane z translacją obejmują działanie mikroRNA, które wiążą się z mRNA i hamują translację poprzez degradację mRNA lub blokowanie inicjacji translacji [95]. Ponadto, inne czynniki regulacyjne, takie jak białka represorowe, mogą oddziaływać na elementy regulacyjne mRNA, powodując zmniejszenie jego stabilności lub blokując dostęp do kompleksu translacyjnego. Z kolei regulacja na poziomie transkrypcji, zwłaszcza poprzez reorganizację chromatyny, może wpływać na dostępność miejsca wiązania czynników transkrypcyjnych i wpływać na ekspresję genów [2].

Istotną rzeczą jest zwrócenie uwagi na fakt, że różne mechanizmy represji genowej potencjalnie mogą działać równolegle i współpracować. Oznacza to, że być może represja genowa może być wynikiem interakcji wielu czynników i procesów, które wzajemnie się uzupełniają i współdziałają. Jednym z celów pracy doktorskiej było opracowanie modelu, który pozwalała to sprawdzić na drodze symulacji.

### 2.7.2 mikroRNA a polisomy

Wiele badań koncentruje się na badaniu możliwości przyłączania się mikroRNA do polisomów, co pozwala zrozumieć rolę tych małych cząsteczek w regulacji translacji. Praca [111] opisuje badania, które miały na celu zbadanie obecności mikroRNA w polisomach za pomocą zaawansowanych metod pomiarowych. Wyniki tego badania potwierdziły, że mikroRNA rzeczywiście można zaobserwować w polisomach. Co ciekawe, większość mikroRNA była przyłączona do lżejszych frakcji polisomalnych, gdzie poziom obłożenia rybosomami nie przekraczał 40% maksymalnego obłożenia na mRNA. Badanie to zostało przeprowadzone na dwóch różnych liniach komórkowych – hESC (komórki macierzyste) oraz hFF (fibroblasty).

Jednym z interesujących odkryć było to, że stopień asocjacji mikroRNA z polisomami oraz preferencje dotyczące przyłączania się do poszczególnych frakcji nie zależały od poziomu ekspresji mikroRNA. Oznacza to, że choć ekspresja mikroRNA może się różnić między różnymi typami komórek, to proces przyłączania mikroRNA do mRNA związanego z polisomami jest regulowany w sposób niezależny od poziomu ekspresji badanego mikroRNA. Wyniki te wskazują na istnienie precyzyjnej regulacji, która determinuje, które mikroRNA będą zaangażowane w proces translacji.

Odkrycie obecności mikroRNA w polisomach ma istotne konsekwencje dla zrozumienia mechanizmów regulacji translacji. mikroRNA mogą oddziaływać na polisomy bezpośrednio lub za pośrednictwem kompleksów regulacyjnych, wpływając na efektywność translacji konkretnych mRNA. Ta forma regulacji translacji, poprzez powinowactwo mikroRNA do polisomów, pozwala na szybką i precyzyjną kontrolę ekspresji genów w odpowiedzi na różne sygnały i warunki środowiskowe.

Oczywiście, ilość mikroRNA obecnego we frakcjach polisomalnych może znacznie się różnić w zależności od stanu i rodzaju komórek. Badania [98] oraz [120], dostarczyły dowodów na zmniejszenie sedymentacji mikroRNA wraz z polisomami po zastosowaniu czynników, które blokują inicjację lub elongację translacji. Wyniki tych badań wskazują na to, że obecność mikroRNA w polisomach jest związana z aktywnym procesem translacji. Gdy czynniki blokujące inicjację translacji lub elongację są obecne, dochodzi do zmniejszenia obłożenia mikroRNA w polisomach. Oznacza to, że mikroRNA jest preferencyjnie przyłączane do mRNA związanego z polisomami podczas aktywnej translacji, gdy dochodzi do tworzenia kompleksu rybosomowego na mRNA i syntezy białek. Blokowanie tych procesów translacyjnych prowadzi do zmniejszenia obecności mikroRNA w polisomach.

## 2.8 Promieniowanie jonizujące

Promieniowanie jonizujące jest to przepływ energii w postaci cząstek atomowych i subatomowych lub fal elektromagnetycznych, który jest w stanie uwolnić elektrony z atomu, powodując naładowanie (lub zjonizowanie) atomu [101, 142]. Promieniowanie jonizujące obejmuje fragment widma elektromagnetycznego i zawiera w sobie promieniowanie rentgenowskie i gamma oraz cząstki subatomowe, takie jak elektrony, neutrony i cząstki alfa (jądra helu, z których każde zawiera dwa protony i dwa neutrony).

Promieniowanie jonizujące, poprzez przemieszczanie elektronów (jonizację), skutecznie rozrywa wiązania molekularne. W organizmach żywych takie zakłócenia mogą powodować rozległe uszkodzenia komórek i ich materiału genetycznego. Charakterystyczny typ uszkodzenia DNA powodowany przez promieniowanie jonizujące, obejmuje pęknięcia zarówno jendonicowe (SSB) jak i dwuniciowe (DSB) [166, 7]. Chociaż większość komórek podtrzymujących takie uszkodzenia wywołane promieniowaniem może

zostać wyeliminowana przez szlaki odpowiedzi na uszkodzenia, niektóre komórki są zdolne do adaptacji do nowo powstałych warunków, rozmnażania się i ostatecznie przechodzenia transformacji złośliwej, co jest kluczowym krokiem w rozwoju raka [7].

Promieniowanie jonizujące jest uznanym czynnikiem ryzyka zachorowania na raka. Badania obejmujące napromienianie komórek i zwierząt doświadczalnych oraz badania epidemiologiczne populacji, które doświadczyły wysokiego poziomu narażenia na promieniowanie z powodów medycznych lub zawodowych, wykazały wyraźne powiązania między promieniowaniem jonizującym a rakiem. Przykłady tego ostatniego obejmują katastrofę w Czarnobylu w 1986 r. oraz bomby atomowe w Hiroszynie i Nagasaki w Japonii w 1945 r [88]. W latach następujących po tych katastrofalnych wydarzeniach tysiące ludzi cierpiało na choroby popromienne i wykazano zwiększoną zachorowalność na raka.

Ryzyko raka wzrasta mniej więcej proporcjonalnie do ilości energii zdeponowanej w tkance (dawka promieniowania, zwykle wyrażana ilościowo w jednostkach Gray [Gy] lub miligray [mGy], gdzie 1 Gy odpowiada 1 dżulowi energii na kilogram tkanki). Jednak narządy i tkanki różnią się pod względem wrażliwości na kancerogenezę popromienną. Ryzyko zachorowania na raka różni się ponadto w zależności od rodzaju promieniowania jonizującego, płci, wieku w chwili narażenia i czasu po ekspozycji oraz czynników stylu życia, takich jak historia rozrodczości i narażenie na inne czynniki rakotwórcze (np. palenie tytoniu).

### 2.8.1 Źródła oraz typy promieniowania jonizującego

Promieniowanie jonizujące powstaje w wyniku radioaktywnego rozpadu niestabilnych izotopów pierwiastków w skałach, glebie i tkankach oraz w wyniku reakcji jądrowych zachodzących w Słońcu i odległych gwiazdach. Większą część narażenia na takie promieniowanie tła można przypisać wdychaniu gazowego radonu, który powstaje w wyniku radioaktywnego rozpadu radu w skałach i glebie, który następnie przedostaje się do atmosfery [101]. Promieniowanie radonu i produktów jego rozpadu radioaktywnego składa się głównie z cząstek alfa, które mają bardzo ograniczoną zdolność penetracji tkanek, ale mogą uszkodzić DNA komórkowe w delikatnych tkankach, np. w płucach [101]. Z kolei promienie gamma i rentgenowskie są wysoce przenikliwe i mogą oddziaływać na komórki nawet wtedy, gdy źródło promieniowania znajduje się na zewnątrz

ciała.

Cząstki alfa ( $\alpha$ ): składają się z dwóch protonów i dwóch neutronów. Ze względu na swoją dużą masę, nie mogą przemieszczać się daleko, ale dzięki podwójnemu ładunkowi dodatniemu cząstki alfa są silnymi czynnikami jonizującymi. Cząsteczki te nie mogą przeniknąć przez skórę i dlatego ekspozycja na cząstki alfa nie powoduje poważniejszych uszkodzeń. Jednak narażenie organów wewnętrznych w wyniku trawienia dowolnego materiału radioaktywnego, który emituje cząstki alfa, może powodować znaczące skutki biologiczne.

Cząstki beta ( $\beta$ ) mają pojedynczy ładunek ujemny (elektron) lub dodatni (pozyton). Ponieważ mają małą masę i mogą być uwalniane z dużą energią, mogą osiągać prędkości bliskie prędkości światła, ale szybko tracą energię w wyniku interakcji z inną materią. Zewnętrzna ekspozycja na cząstki beta może wpływać na skórę tylko jak oparzenie słoneczne, ale ekspozycja wewnętrzna może być szkodliwa dla tkanek.

Promienie gamma ( $\gamma$ ) i promienie rentgenowskie są rodzajami fal elektromagnetycznych i są opisywane jako czysta energia lub fotony, które mogą wytwarzać jony podczas przechodzenia przez materiały. Ze względu na dużą zdolność penetracji mogą docierać do głębokich narządów i tkanek, ale nie mają dużej gęstości jonizacji, a ich działanie biologiczne jest podobne do cząstek beta.

Różne rodzaje promieniowania różnią się nieco skutecznością biologiczną na jednostkę dawki. Na przykład promieniowanie cząstek alfa zaabsorbowane w tkance jest uważane za około 20 razy bardziej skuteczne jako czynnik rakotwórczy niż promieniowanie gamma w tej samej dawce. Pojęcie dawki równoważnej, wyrażonej w jednostkach siwertów (Sv), zostało wprowadzone na potrzeby ochrony przed promieniowaniem. W przypadku promieniowania gamma, dawka 1 mGy odpowiada dawce równoważnej 1 mSv, natomiast w przypadku promieniowania alfa dawka 1 mGy odpowiada dawce równoważnej 20 mSv. Na całym świecie średnia roczna ekspozycja człowieka na naturalne promieniowanie tła wynosi 2,4 mSv rocznie.

Zestawienie różnych rodzajów promieniowania oraz ich charakterystyka zostały przedstawione w tabeli 2.2.

Tablica 2.2: Rodzaje promieniowania jonizującego w kolejności rosnącej energii. Na podstawie [158]

Rodzaj promieniowania jonizującego	Natura falowa/cząsteczkowa	Źródło emisji	Energia
Cząstki $\alpha$	Dwa protony i dwa neutrony	Rozpad jądrowy	Niska
Cząstki $\beta$	Elektron lub pozyton	Rozpad jądrowy	Średnia
Promieniowanie rentgenowskie	fotony	Poza jądrem (np. w wyniku bombardowania atomów elektronami)	Wysoka
Promieniowanie $\gamma$	fotony	Rozpad jądrowy (emitowany wraz z cząstkami $\alpha$ i / lub $\beta$ )	Bardzo wysoka

### 2.8.2 Efekty promieniowania

Powyżej pewnych progów dawek, promieniowanie może upośledzać funkcjonowanie zarówno tkanek jak i narządów oraz powodować skutki, takie jak zaczerwienienie skóry, wypadanie włosów, oparzenia popromienne lub ostry zespół popromienny. Efekty te są bardziej dotkliwe przy wyższych dawkach. Na przykład próg dawki dla ostrego zespołu popromiennego wynosi około 1 Sv [70].

Jeśli dawka promieniowania jest niska i jest dostarczana przez dłuższy czas (niska moc dawki), ryzyko jest znacznie mniejsze ze względu na większe prawdopodobieństwo naprawy uszkodzeń. Nadal jednak istnieje ryzyko długoterminowych skutków, takich jak rak, które mogą pojawić się po latach, a nawet dziesięcioleciach.

Promieniowanie jonizujące bezpośrednio wpływa na strukturę DNA poprzez indukowanie pęknięć DNA, w szczególności podwójnoniciowe pęknięcia DNA (DSB) [3, 134]. Efekty wtórne to wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT), które utleniają białka i lipidy, a także indukują szereg uszkodzeń DNA, takich jak tworzenie miejsc bezzasadowych i pęknięć pojedynczej nici (SSB). Łącznie wszystkie te zmiany indukują śmierć komórki i niepowodzenie mitozy. Kiedy DNA jest uszkodzone, mechanizm naprawczy komórki jest aktywowany i zatrzymuje cykl komórkowy w określonych punktach kontrolnych, aby naprawić uszkodzenia DNA i zapobiec kontynuacji cyklu. Wiadomo, że na wrodzoną radiowrażliwość komórek nowotworowych duży wpływ ma zdolność komórek do naprawy DSB [108]. Jeśli komórki nowotworowe są w stanie skutecznie naprawić



uszkodzenia spowodowane promieniowaniem, rozwija się odporność na promieniowanie, umożliwiając komórkom przeżycie i replikację. Jeśli uszkodzenie pozostaje nienaprawione, mechanizmy te indukują zaprogramowaną śmierć komórki lub apoptozę, aby zapobiec gromadzeniu się mutacji w komórkach potomnych [26, 48].

### 2.8.3 Promieniowanie jonizujące a translacja

W warunkach stresowych, takich jak ekspozycja na IR, ścieżki odpowiedzi mogą zmieniać inicjację translacji na kilku kluczowych etapach. Kiedy w komórkach dochodzi do poważnego uszkodzenia DNA (np. po ekspozycji na dawki IR wynoszącej 1 Gy i więcej), natychmiastową reakcją jest przekierowanie wszystkich zasobów w celu złagodzenia stresu i naprawy uszkodzeń [158]. Wymaga to zatrzymania cyklu komórkowego i wyłączenia wszystkich funkcji, które mogą zwiększać stres komórkowy. Biorąc pod uwagę wysoki koszt energetyczny translacji mRNA (wynoszący około 40% całych zasobów energetycznych komórki), naturalnym jest, że komórka doprowadza do globalnego zatrzymania tego procesu dla prawie wszystkich białek. Istnieją pewne wyjątki w postaci białek zaangażowanych w procesy naprawcze DNA, do których głównie należą białka ze szlaku sygnałowego p53 [173, 180].

Regulacja translacji w wyniku stresu zachodzi na wszystkich jej etapach, jednak głównie jest ona obserwowana na etapie inicjacji [65, 94, 144]. Zatrzymanie translacji wynika z modyfikacji elementów maszynery translacyjnej lub ich dostępności, a także z subkomórkowych zmian w lokalizacji mRNP (ang. *messenger ribonucleoprotein*). Choć cele wykorzystywane w regulacji na etapie inicjacji są liczne, dwa czynniki inicjacji translacji są głównymi celami kontroli translacji - eIF2 i eIF4E. Ponieważ większość eukariotycznych mRNA opiera się na aktywności tych czynników dla wydajnej translacji, wszelkie zakłócenia w eIF2 lub eIF4E mogą mieć głęboki wpływ na translację, prowadząc do szybkich odpowiedzi, co jest kluczową cechą zintegrowanej odpowiedzi na stres. Funkcje tych czynników inicjacyjnych są ściśle regulowane przez szlaki transdukcji sygnału, które wykazują wysoką wrażliwość na różne stresory i bodźce fizjologiczne. Co ważne, inicjacja translacji wywołana stresem jest procesem odwracalnym, a po złagodzeniu stresu translacja zostaje przywrócona, co pozwala na wznowienie optymalnych parametrów translacji. Poza samym procesem translacji, promieniowanie może mieć bezpośredni wpływ na cząsteczki biorące udział w translacji, np. poprzez endonukleolityczne cięcie tRNA [24, 65, 163].

Stres również może uszkodzić mRNA, powodując powstawanie błędów podczas procesu translacji [147, 160]. Spośród różnych molekuł biorących udział w translacji, wpływ stresu oksydacyjnego na rybosomy pozostaje najmniej zbadany.

#### **2.8.4 Promieniowanie jonizujące a polisomy**

Promieniowanie jonizujące ma znaczący wpływ na profil polisomalny komórek. Badania przeprowadzone [144, 43] wykazały, że reaktywne formy tlenu, które powstają w wyniku napromieniowania komórek, przyczyniają się do akumulacji monosomów. Oznacza to, że rybosomy nie przemieszczają się wzdłuż matrycy mRNA, co prowadzi do blokady miejsc dla większej liczby rybosomów. Co zaskakujące, podczas analiz mRNA, których w wyniku stresu oksydacyjnego poziomy powinny być zwiększone, zaobserwowano większe obłożenie we frakcjach polisomalnych.

Pomimo że istnieje ograniczona liczba badań nad tym zagadnieniem, ogólnie rzecz biorąc, promieniowanie hamuje translację i tworzenie polisomów [99, 155], a akumulacja monosomów jest jednym z efektów promieniowania na proces translacji [99, 155].

#### **2.8.5 Promieniowanie jonizujące a mikroRNA**

W literaturze można napotkać wiele dowodów na to, że mikroRNA w obecności promieniowania wykazuje aktywną odpowiedź. Ponadto udowodniono, że mikroRNA, w warunkach stresu oksydacyjnego może pełnić funkcje biomarkerów uszkodzeń [72]. mikroRNA mają również zdolność regulowania odpowiedzi komórkowej na IR, poprzez udział w wielu szlakach związanych z naprawą DNA, punktami kontrolnymi cyklu komórkowego, apoptozą, autofagią i stresem oksydacyjnym [21, 41, 69, 72, 148, 172].

Inne badania wykazały, że rozregulowanie niektórych pojedynczych mikroRNA ułatwia postęp reakcji niepożądanych wywołanych promieniowaniem lub sprzyja wrażliwości na promieniowanie [164, 190].

## Rozdział 3

# Modelowanie procesu translacji

Ze względu na brak możliwości eksperymentalnego sprawdzenia niektórych hipotez dotyczących mechanizmów regulacji translacji, coraz częściej badacze posługują się modelami matematycznymi. Istnieje wiele modeli, które służą do opisu różnych aspektów tego procesu, począwszy od ogólnego opisu całej translacji, aż po bardziej szczegółowe etapy oraz regulację translacji opartą na działaniu czynników regulatorowych. Modele matematyczne translacji białek uwzględniają fundamentalne reakcje biochemiczne, stałe szybkości tych reakcji oraz mogą brać pod uwagę biologiczny szum i czynniki regulacyjne.

Istnieje wiele podejść do modelowania translacji. Jednym z popularnych podejść są deterministyczne modele, które opierają się na równaniach różniczkowych. Te modele opisują dynamikę procesu translacji jako ciągłe zmiany stężeń cząsteczek i uwzględniają relacje między nimi. Innym podejściem są symulacje stochastyczne, które uwzględniają losowe zdarzenia i fluktuacje występujące w procesie translacji. Symulacje stochastyczne pozwalają na analizę indywidualnych cząsteczek i uwzględniają nieliniowe zależności oraz przypadkowe zmiany w przebiegu procesu translacji. W ostatnich latach, metody oparte na uczeniu maszynowym również znalazły zastosowanie w modelowaniu translacji. Wykorzystując duże zbiory danych eksperymentalnych, modele oparte na uczeniu maszynowym są w stanie identyfikować wzorce i zależności między sekwencją mRNA a efektywnością translacji [18].

Dzięki modelowaniu matematycznemu naukowcy zgłębili wiedzę na temat podstawowych mechanizmów translacji. Odkryli m.in. rolę czynników inicjacji, elongacji i ter-

minacji w procesie translacji oraz wpływ użycia kodonów i struktury drugorzędowej mRNA na efektywność translacji. Modelowanie przyczyniło się również do identyfikacji nowych elementów regulacyjnych, które wpływają na proces translacji, a także do projektowania syntetycznych sekwencji mRNA w celu optymalizacji ekspresji białek [195]. Dzięki zastosowaniu modeli matematycznych można przewidzieć i eksplorować różne scenariusze translacji, co prowadzi do bardziej precyzyjnych eksperymentów i lepszego zrozumienia biologicznych procesów zachodzących w komórkach.

W niniejszym rozdziale skupiono się wyłącznie na modelach translacji uwzględniających polisomy.

### 3.1 Modele oparte na ODE

Jednym z najczęściej stosowanych podejść jest modelowanie oparte na równaniach różniczkowych (ODE). Równania te opisują szybkość zmian np. ilości molekuł, w odniesieniu do jednostki czasu. W kontekście szlaków sygnałowych, ODE można wykorzystać do modelowania interakcji pomiędzy białkami, enzymami i innymi cząsteczkami uczestniczącymi w kaskadach sygnałowych. Konstrukcja modeli opartych na ODE jest metodą względnie prostą. W literaturze powstały modele translacji z uwzględnieniem polisomów w układzie.

W pracy [114] skupiono się na modelowaniu translacji w odpowiedzi na obecność mikroRNA. Model ten również bierze pod uwagę możliwość regulacji przez mikroRNA z wykorzystaniem różnych mechanizmów. Uwzględniono 9 potencjalnych mechanizmów i sprawdzono odpowiedzi modelu dla różnych kombinacji „siły” oddziaływania konkretnych mechanizmów oraz siły oddziaływania mikroRNA. Jako wyjście modelu, sprawdzono poziom mRNA, ilość rybosomów na mRNA oraz poziom białka.

Praca [197], przedstawia pełny, deterministyczny model translacji, w którym szczególną uwagę poświęcono etapowi elongacji. Szybkość syntezy została przedstawiona jako funkcja gęstości rybosomów na mRNA. W modelu wzięto również pod uwagę ograniczenia kinetyki reakcji dla wszystkich etapów translacji (inicjacja, elongacja oraz terminacja). Rozkład rybosomów wzdłuż mRNA oraz kinetyka elongacji zostały zbadane poprzez analizę sekwencji. Model na wyjściu przedstawia wartości współczynnika prędkości translacji, w zależności od zajętości mRNA przez rybosomy, a także zmiany kine-

tyki w zależności od zmian parametrów odpowiedzialnych za elongację oraz terminację.

Model [116] koncentruje się wyłącznie na etapie inicjacji translacji i, bazując na wpływie struktur drugorzędowych mRNA oraz na sekwencji mRNA, szacuje wydajność translacji. Opisany model jest modelem ODE oraz probabilistycznym, gdzie obliczane jest prawdopodobieństwo rozfałdowania się struktury 2-rzędowej mRNA, zapewniając tym samym dostęp do RDS (*ribosome docking site*). Wyliczone jest również prawdopodobieństwo, że dane mRNA w ogóle zwiąże się z rybosomem w tzw. miejscu RRS - *ribosome-recognizing sequence*. Wyjściem modelu były oszacowane wartości ekspresji.

W modelu [20], opracowano model matematyczny translacji, uwzględniający ograniczenie zasobów w komórce (rybosomów oraz RNaz) oraz zmianę ich rozkładu, będącą wynikiem regulacji mikroRNA z docelowym mRNA. Wykazano, że związek pomiędzy obniżeniem ekspresji regulowanego genu a zwiększeniem ekspresji genów, potencjalnie nie powiązanych ze sobą żadnym szlakiem sygnałowym, może być właśnie spowodowany redystrybucją zasobów, a w szczególności rybosomów, poprzez zmianę profilu polisomalnego. Zaproponowany model został przedstawiony w postaci ODE, a wyjściem modelu są poziomy stężenia wolnych rybosomów oraz gęstość rybosomów na mRNA, w zależności od zadanych warunków, symulujących różne formy oddziaływania mikroRNA-docelowe mRNA. Przedstawiono również wyniki profili degradacji mRNA, w zależności od zmian parametrów w modelu, odpowiedzialnych za ilość dostępnych zasobów RNaz.

## 3.2 TASEP

Poza modelami ODE, coraz bardziej popularną metodą modelowania translacji oraz jej elementów jest modelowanie z wykorzystaniem techniki TASEP - *totally asymmetric single exclusion model*. W szczególności ta metoda modelowania jest przydatna w modelowaniu translacji z uwzględnieniem, polisomów w układzie [141, 156]. TASEP polega na utworzeniu jednowymiarowej sieci złożonej z miejsc, wzdłuż której przesuwa się pojedynczy rodzaj cząstek (tu-rybosom). Cząstki przesuwać się wzdłuż sieci ze stałą prędkością, pod warunkiem, że kolejne miejsce w sieci jest wolne. Cząsteczka wchodzi i wychodzi z sieci z różnymi wartościami współczynników. Pomimo swojej prostoty, model TASEP wykazuje szeroki wachlarz interesujących i nietrywialnych zachowań,

w zależności od konkretnych parametrów systemu. Na przykład model może wykazywać przejścia fazowe, w których zachowanie systemu zmienia się nagle wraz ze zmianą parametru. TASEP, w kontekście modelowania translacji, pozwala na wierne odtworzenie niektórych procesów, np. przedwczesne odłączanie się rybosomów czy tzw. *ribosome traffic jams*, czyli ograniczenie tempa translacji w wyniku zbyt gęstego upakowania rybosomów, spowodowanego zbyt powolnym przesuwaniem się rybosomów wzdłuż mRNA. Ponadto, TASEP jest świetną metodą modelowania translacji z uwzględnieniem polisomów w układzie.

W [29] zaproponowano model translacji z uwzględnieniem opóźnień oraz oszacowano, iż około 20% rybosomów ulega zatrzymaniu w wyniku korków. Symulacje przedstawiono, bazując na eksperymencie wyznaczającym ślad rybosomów - Ribo-seq, w komórkach drożdży.

W modelu [13] skupiono się na konkretnym i powszechnym zjawisku przedwczesnego odłączania się rybosomów z mRNA. Praca ta skupiła się na udowodnieniu, że *ribosome drop-off* jest zależne od sekwencji oraz od panujących w układzie warunków (np. stres). Powstały również inne modele, oparte na metodzie TASEP (RFM- *ribosome flow model*) [135, 193].

### 3.3 Sieci Petriego

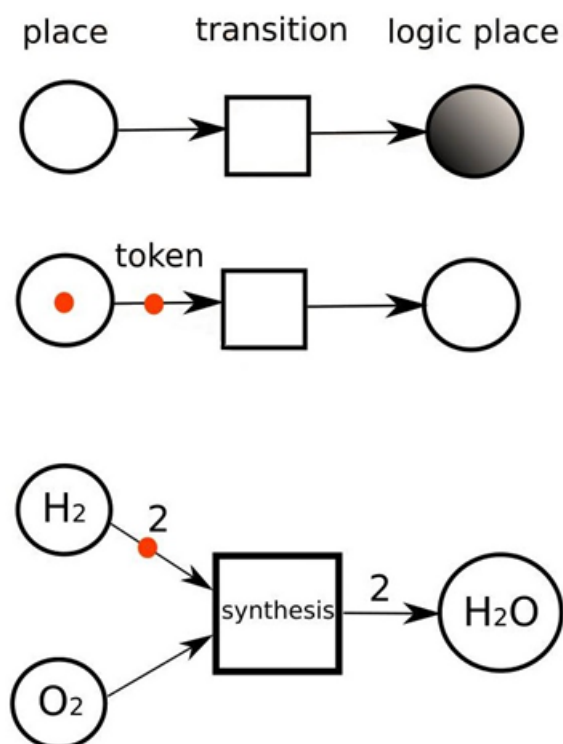
Sieci Petriego (Petri Nets - PN) to graficzne narzędzie do modelowania używane do opisywania i analizowania zachowania systemów dyskretnych. Sieci Petriego zostały wprowadzone przez Carla Adama Petriego w latach 60. XX wieku jako formalizm opisujący zachowanie reakcji chemicznych. Sieci Petriego to obiekty matematyczne o strukturze skierowanego ważonego grafu dwudzielnego. Zbiór wierzchołków takiego grafu można podzielić na dwa rozłączne podzbiory w taki sposób, że wierzchołki należące do tego samego podzbioru nie są połączone łukiem. W kontekście sieci Petriego wierzchołki będące elementami jednego z tych podzbiorów nazywane są miejscami, a elementy drugiego – tranzycjami. Kiedy sieć Petriego jest modelem jakiegoś systemu, miejsca odpowiadają jej elementarnym składnikom pasywnym (np. związkom chemicznym), a przejścia odpowiadają elementarnym składnikom aktywnym (np. reakcjom chemicznym). Graf dwudzielny opisuje strukturę modelowanego systemu. Poza zbudowanym

grafem, jest jeszcze jeden istotny element sieci - żetony (tokeny), które wprowadzają do sieci swoistą dynamikę. Znajdują się one w miejscach i przepływają z jednego miejsca do drugiego poprzez tranzycje. Przepływ ten odpowiada przepływowi substancji, sygnałów itp. przez modelowany system. Reguluje to zasada odpalania przejść. Zgodnie z tą regułą przejście jest aktywne, jeśli liczba żetonów we wszystkich pre-miejscach tego przejścia (tj. miejscach, które są jego bezpośrednimi poprzednikami) jest równa lub większa od wag łuków łączących te miejsca z przejściem. Aktywne przejście może zostać uruchomione, co oznacza, że tokeny mogą płynąć z jego pre-miejsc do jego post-miejsc (tj. miejsc, które są bezpośrednimi następcami przejścia). Liczba przepływających tokenów jest równa wadze odpowiednich łuków.

Sieci Petriego mają bardzo intuicyjną reprezentację graficzną, która jest pomocna w zrozumieniu struktury i zachowania modelowanego systemu. W powyższej interpretacji, miejsca są przedstawione w postaci kół, tranzycje jako prostokąty, łuki jako strzałki, a tokeny jako kropki lub cyfry znajdujące się w miejscach. Wagi, będące dodatnimi liczbami całkowitymi, są reprezentowane jako liczby związane z łukami (jeśli waga jest równa jeden, nie jest pokazywana) (rysunek 3.1).

Metody analizy modeli opartych na sieciach Petriego pozwalają na prowadzenie analizy strukturalnej obejmującej analizę istotności, analizę nokautów oraz poszukiwanie znaczącego podzbioru przejść. Takie analizy są ważne dla określenia istotności procesów elementarnych lub większych podprocesów. W roku 2012 Brackley et al zaproponowali model translacji oparty na czasowych sieciach Petriego [14]. Czasowe sieci są rozszerzoną wersją klasycznych sieci, gdzie do każdego miejsca dodany jest czas oczekiwania. W momencie pojawienia się tokenu w miejscu, tranzycja może się aktywować dopiero po upływie zadanego czasu tau. Brackley zaproponował translację w formie dwóch rzędów miejsc, gdzie każda para reprezentuje kodon. Górny rząd wskazuje, że kodon jest tłumaczony przez rybosom, a dolny oznacza, że dany kodon jest wolny. Model ten oblicza szybkość produkcji białka oraz gęstość rybosomów na mRNA.

Kilka lat później powstał model oparty na kolorowanych sieciach Petriego (*Colored Petri nets* - CPN) [191]. Kolorowane sieci Petriego są bardzo ciekawą wariacją klasycznych sieci. W kolorowanych sieciach Petriego, tokeny są oznaczane różnymi kolorami [71]. W CPN tokeny mogą być powiązane z określonymi wartościami lub zakresami wartości, które mogą być używane do reprezentowania różnych aspektów systemu, takich jak stan komórki lub ilość określonego zasobu. W modelu Yanga, zostało wykorzystane



Rysunek 3.1: Reprezentacja graficzna Sieci Petriego. Przedstawiono zasadę przejścia z jednego miejsca do drugiego na podstawie syntezy wody.

sześć kolorów, które są przypisane takim cechom, jak np. kodon, pozycja kodonu, numer nici mRNA itp. Aby sieć funkcjonowała sprawnie, zostały również zdefiniowane priorytety przejść tokenów, w zależności od koloru tokenu. Model, poza symulacją samej translacji, służy również do określania typu oraz częstości mutacji w transkrypcie, poprzez analizę porównawczą pomiędzy oryginalną a zmutowaną sekwencją DNA.

### 3.4 Inne modele

Oprócz modeli ODE, TASEP i PN, istnieje wiele innych propozycji modeli opartych na mniej popularnych metodach modelowania oraz skupiających się na mniej popularnych aspektach translacji. W literaturze można znaleźć modele stochastyczne, które uwzględniają losowe zdarzenia i fluktuacje w procesie translacji [23, 31, 45, 143, 149]. Takie modele uwzględniają nieliniowe i losowe zmienne, które mogą mieć istotny wpływ na dynamikę procesu translacji.



Innym podejściem jest wykorzystanie modeli statystycznych do analizy translacji [167]. Modele statystyczne opierają się na analizie danych eksperymentalnych i wykorzystują statystyczne techniki, aby zrozumieć i opisać proces translacji w komórce. Te modele mogą uwzględniać różnorodne czynniki, takie jak czasy trwania poszczególnych etapów translacji i tempo degradacji białek.

W ostatnich latach pojawiły się również modele oparte na uczeniu maszynowym, które wykorzystują techniki z dziedziny sztucznej inteligencji do analizy translacji [18, 152]. Modele te korzystają z dużych zbiorów danych eksperymentalnych, aby nauczyć się zależności między sekwencją mRNA a efektywnością translacji. Dzięki temu można przewidywać efektywność translacyjną nowych sekwencji mRNA na podstawie wcześniej zebranych danych treningowych.

W niniejszej rozprawie zaproponowany model opiera się na oryginalnej z punktu widzenia modelowania procesów biologicznych metodzie – maszynach stanowych. Wybrano tę metodę modelowania ze względu na wiele podobieństw pomiędzy koncepcją i budową maszyn stanowych, a procesem translacji, począwszy od niezbędnych do przeprowadzenia translacji molekuł, po sam proces.

Tablica 3.1: Zestawienie wszystkich przedstawionych w pracy modeli ze względu na typ modelowania.

<b>Typ modelowania</b>	<b>Literatura</b>
ODE	[20, 114, 116, 197]
TASEP	[13, 29, 135, 193]
Sieci Petriego	[14, 191]
Modele stochastyczne	[167]
Modele oparte na uczeniu maszynowym	[18, 152]

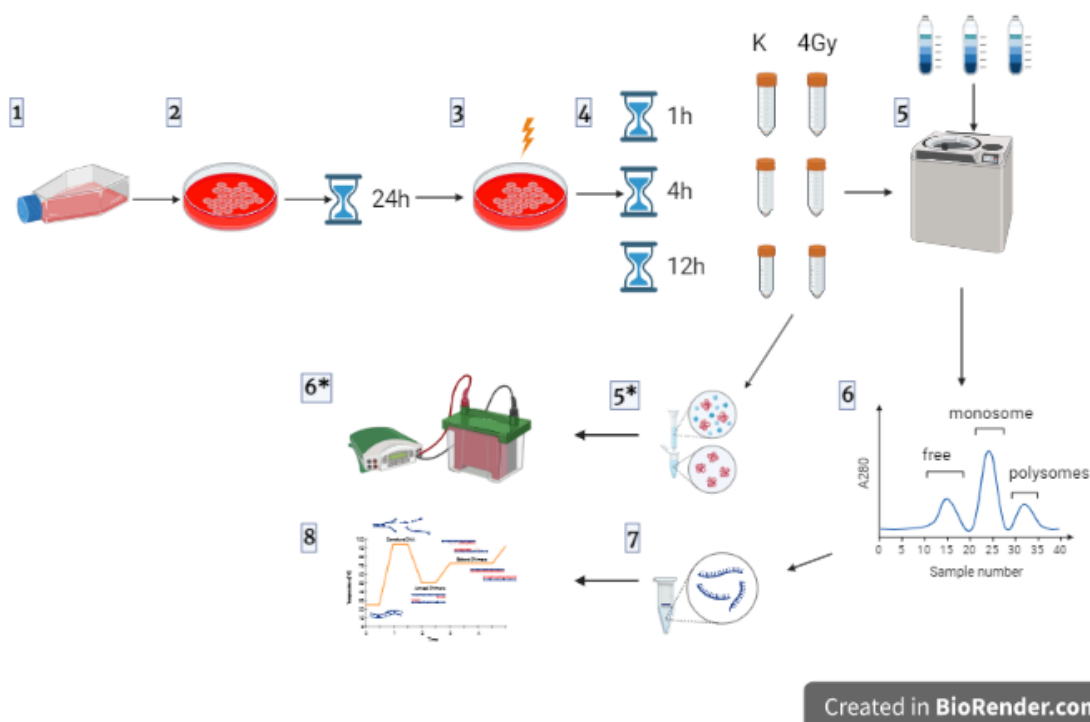


## **Rozdział 4**

# **Metodyka badań biologicznych**

Niniejszy rozdział zawiera opisy protokołów wykorzystanych w prezentowanej Rozprawie Doktorskiej. Protokoły zostały opracowane w oparciu o istniejące w literaturze rozwiązania, jednak ze względu na specyfikę wykonywanych badań, zostały one odpowiednio zmodyfikowane.

Część eksperymentalna przedstawionej pracy doktorskiej obejmuje hodowlę komórkową, specjalną procedurę zbierania komórek do analizy frakcji polisomalnych, ultrawirowanie, rozdzielanie lizatu na frakcje, izolację RNA, izolację białek, syntezę cDNA, qPCR oraz Western Blotting (schemat procedury eksperymentalnej przedstawia rysunek 4.1). Każdy z tych etapów został szczegółowo opisany w tym podrozdziale. Eksperymenty biologiczne były przeprowadzone dla linii komórkowej HCT116 (komórki nowotworu okrężnicy, ATCC nr kat. CCL-247).



Rysunek 4.1: Schemat procedury eksperymentalnej. Ścieżka z punktami oznaczonymi gwiazdką dotyczy procedury oznaczania białek, natomiast bez gwiazdki dotyczy ścieżki oznaczania mRNA oraz mikroRNA.

## 4.1 Hodowla Komórkowa

Hodowla komórkowa dla HCT116 była prowadzona w standardowych warunkach: komórki hodowano w butelkach hodowlanych 75 cm<sup>3</sup> w pożywce DMEM F12 1:1 MIX (PAN Biotech, nr kat.: P04-41150) z dodatkiem FBS o końcowym stężeniu w pożywce wynoszącym 10 % (EURX, nr kat. E-5051-02). Hodowla przechowywana była w inkubatorze w warunkach standardowych do prowadzenia hodowli komórkowych - stałe stężenie dwutlenku węgla, wynoszące 5% oraz stała temperatura wynosząca 37°C.

Zbieranie komórek do analiz frakcji polisomalnych jest popularnym protokołem opisywanym w literaturze.

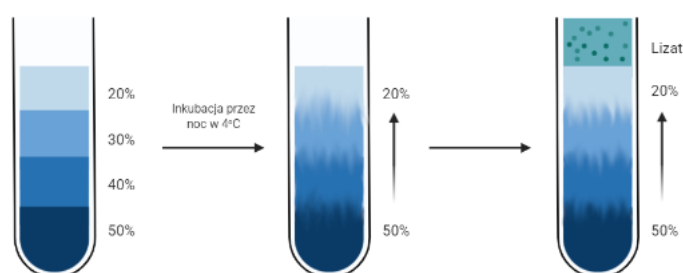
Dla każdego gradientu wysiewano około 10 milionów komórek, rozdzielonych na trzy szalki Petriego o średnicy 15 cm. Po około 24 godzinach wymieniano pożywkę i

napromieniowano komórki dawką promieniowania jonizującego wynoszącą 4 Gy. Następnie przenoszono ponownie komórki do inkubatora i w odpowiednich punktach czasowych (4 i 12 godzin po napromieniowaniu) prowadzono procedurę zbierania komórek, opisaną poniżej.

Zbieranie komórek rozpoczęto od zablokowania rybosomów. W tym celu do medium dodawano roztworu cykloheksimidu (SigmaAldrich), aby końcowe stężenie CHX w medium wynosiło 100 ng/ml. Następnie inkubowano komórki przez 10 minut. Kolejnym etapem było zebranie komórek. Aby rybosomy nie odłączyły się od mRNA, po zakończonej inkubacji zdejmowano medium i dodawano zmrożony PBS z dodatkiem CHX o takim samym stężeniu końcowym, jakie było w pożywce (100 ng/ml). Następnie za pomocą skrobaczki zdejmowano komórki z szalek i przenoszono do probówki typu falcon. Pobierano z każdej probówki po 2 ml zawiesiny komórkowej do analizy białek i wirowano w temperaturze pokojowej przy prędkości 3000 obr/min przez 3 minuty. Pozostałe komórki odwirowano w wirówce w temperaturze 4°C przy prędkości 3000 obr/min przez 3 minuty. Po odwirowaniu wylewano nadsącz, a osad komórkowy zamrażano natychmiast w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu dalszych analiz.

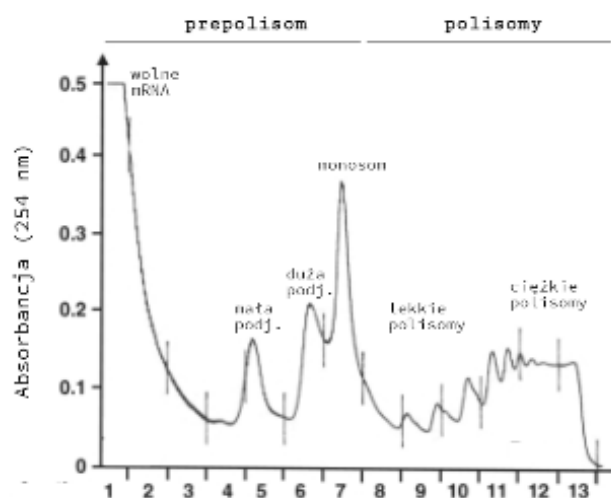
## 4.2 Wirowanie i rozdział frakcji

Wirowanie jest procesem, w którym rozdziela się cięższe frakcje od lżejszych w gradiencie sacharozowym [124]. W przypadku wirowania przy bardzo wysokich obrotach (ultrawirowanie) w gradiencie sacharozowym (rysunek 4.2), rozdzielane będą frakcje polisomalne w zależności od poziomu obsadzenia rybosomów na mRNA. Gradient sacharozowy ma na celu zatrzymanie



Rysunek 4.2: Schemat procesu tworzenia gradientu sacharozowego w probówce do ultrawirowania. Rysunek wykonano w aplikacji BioRender.

w zawiesinie rybosomów (rybosomy są organellami o dużej masie i wirowanie w roztworze o mniejszej gęstości mogło by doprowadzić do całkowitej sedymentacji rybosomów [150]. W tym celu przygotowano gradient sacharozowy o stężeniu 20-50 % (z krokiem co 10 %) rozpuszczony w buforze do polisomów. Do próbówki specjalnie przeznaczonej do wirowania w ultrawirówce o objętości 12,5 mL (Beckman Coulter, open top) dodano warstwami po 2,5 ml roztworu sacharozy w kolejności przedstawionej na rysunku 4.2 i pozostawiono na noc w temperaturze 4°C w celu wyrównania się gradientu. Komórki rozmrożono na lodzie. Następnie zawieszono je w 2 ml buforu do lizy i inkubowano na lodzie przez 10 minut. Następnie, w celu pozbycia się błon, odwirowano zawiesinę komórkową w temperaturze 4°C przy prędkości 12000 obr/min przez 10 minut. Po skończonym wirowaniu, nadsącz przeniesiono do osobnej próbówki, a osad odrzucono. Następnie do przygotowanych wcześniej gradientów ostrożnie, po ściance próbówki, wkroplono lizat komórkowy. W celu uniknięcia błędu związanego z nieprawidłową przeciwwagą podczas wirowania, wszystkie próbówki zostały zważone z dokładnością do 0,1 g oraz, jeżeli zaszała taka konieczność - uzupełnione buforem do lizy. Po zważeniu, próbówki umieszczono w rotorze SW41-Ti firmy Beckman Coulter, który następnie osadzono na trzpieniu znajdującym się w wirówce (wirówka wraz z rotorem została wcześniej schłodzona do temperatury 4°C), zamknięto właz, wypompowano powietrze i rozpoczęto wirowanie (40000 obr/min, 4 godziny). Po skończonym wirowaniu próbówki były kolejno umieszczane w urządzeniu służącym do rozdzielania frakcji (*Fraction Recovery System* firmy Beckman Coulter) i grawitacyjnie rozdzielono zawartość próbówki do mini próbek typu eppendorf po około dwie krople na próbkę. Przed umieszczeniem próbówki z gradientem, cały układ był płukany buforem do polisomów, a po skończonej pracy wodą dejonizowaną. W każdej próbówce zmierzono poziom RNA, w celu utworzenia rozkładu poziomu RNA w gradiencie. Na podstawie dostępnej literatury wiadomo, w jaki sposób można zidentyfikować charakterystyczne punkty w rozkładzie, takie jak np. pik przedstawiający monosom (Rys. 4.3). Bazując na własnych, zmierzonych rozkładach, rozdzielono gradient na cztery główne frakcje: wolne mRNA i mRNA z małą podjednostką, duża podjednostka i monosom, lekkie polisomy oraz ciężkie polisomy.



Rysunek 4.3: Wykres przedstawiający wartości stężenia RNA w gradiencie sacharozowym.

### 4.3 Izolacja RNA i mikroRNA

Izolacja RNA i mikroRNA została przeprowadzona zgodnie z protokołem dołączonym do użytego zestawu do izolacji całkowitego RNA (EURX, Universal RNA/mikroRNA Purification Kit, nr kat. E3599).

### 4.4 Synteza cDNA

Syntezę cDNA dla RNA przeprowadzono zgodnie z protokołem dołączonym do użytego zestawu do odwrotnej transkrypcji NG dART RT kit (EURX, nr kat. E0801). Syntezę cDNA dla mikroRNA natomiast przeprowadzono zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu *miRNA 1st-Strand cDNA synthesis Kit* (Agilent, nr kat. 600036). Zarówno dla RNA jak i mikroRNA, przeprowadzono syntezę, dodając do reakcji po 800 ng wyizolowanego RNA.

### 4.5 qPCR

Reakcja qPCR dla RNA została przeprowadzona z indywidualnym protokołem dla każdego transkryptu (tabela przedstawiona poniżej). Mieszaniny reakcyjne zostały przy-

gotowane dla wszystkich transkryptów w ten sam sposób - zgodny z protokołem zestawu do qPCR użytego w pracy eksperymentalnej (*A&A Biotechnology, RT qPCR Mix SYBR®A*, nr kat. 2008-1000A). Za pomocą przeprowadzenia reakcji qPCR w gradiencie temperaturowym, dobrano optymalną (dającą najwięcej specyficznego) ilość nakładanego cDNA oraz temperatury topnienia dla wszystkich transkryptów.

W przypadku prowadzenia reakcji qPCR dla mikroRNA, również przeprowadzono ją zgodnie z protokołem załączonym do zestawu (*Agilent, miRNA qPCR MasterMix*, nr kat. 600583). Protokół reakcji zarówno dla obu linii, jak i dla badanych mikroRNA jest ustandaryzowany przez producenta zestawu do qPCR i nie został poddany żadnym modyfikacjom. Ilość cDNA na reakcję wynosiła 2,7 ng. Wszystkie reakcje qPCR, zarówno dla mRNA jak i mikroRNA zostały przeprowadzone dla każdej wydzielonej frakcji poliosomalnej, w trzech powtórzeniach biologicznych oraz technicznych.

## 4.6 Izolacja oraz oznaczenie stężenia białek

Izolację białek przeprowadzono z użyciem buforu do lizy *Cell Lysis Buffer (10X)* (*Cell Signaling TECHNOLOGY*, nr kat. 9803). Osad komórkowy zawieszono w buforze o objętości zalecanej przez producenta i inkubowano w temperaturze 4°C przez godzinę, od czasu do czasu mieszając zawiesinę przez pipetowanie, a następnie odwirowano w temperaturze 4°C przy prędkości 12000 obr/min przez 10 minut. Po skończonym wirowaniu zebrano do osobnej probówki nadsącz, który zawierał białka, a osad odrzucono. Ilość białka oznaczono metodą Bradforda (metoda bazująca na pomiarze absorbancji po dodaniu do roztworu zawierającego białka odczynnika Bradforda). Stężenie oszacowano za pomocą krzywej opartej na pomiarze absorbancji dla białka BSA w szeregu rozcieńczeń (od 0,5 mg/ml do 5 mg/ml). Wyizolowane białka przechowywano w temperaturze -20°C do czasu prowadzenia dalszych badań.



Tablica 4.1: Sekwencje starterów. Transkrypt GAPDH oraz SNORD44 posłużyły jako referencje.

Starter	Forward	Reverse
GAPDH	CTTCTTTTGCCTCGCCAGCC	TTCTCAGCCTTGACGGTGCC
P53	CTGAAATCACCGGGCAGGTC	CATCATTGGGGAGGCTTGGG
PTEN	ATGTGAAGGTCTGAATGAGG	TTCTATGGGGATGGTAACTG
miR-638	GGCGGGTGGCGGCCT	Uniwersalny primer dołączony do zestawu
miR-29a	TAGTAGCACCATCTGAAATCGG	Uniwersalny primer dołączony do zestawu
SNORD44	CCTGGATGATGATGATAAGCAAATGC	Uniwersalny primer dołączony do zestawu

## 4.7 Western Blot

Przygotowane oraz zmierzone próbki zawierające białka rozmrażano na lodzie, a następnie pobierano odpowiednie objętości, aby ilość białka w każdej próbce była taka sama (30  $\mu\text{g}$ ). Finalna objętość wszystkich próbek wynosiła 20  $\mu\text{l}$  (wyzolowane białko o objętości nieprzekraczającej 15  $\mu\text{l}$  + 5  $\mu\text{l}$  buforu obciążającego LB + opcjonalnie woda destylowana w celu uzupełnienia do końcowej objętości próbki). Następnie białka poddawano 5 minutowej denaturacji w temperaturze 95°C w termobloku i odwirowywano przez 5 minut przy maksymalnych obrotach (15000 obr/min) w temperaturze pokojowej. Do studzienek w przygotowanym wcześniej żelu poliakrylamidowym (w zależności od masy białka był to żel 10% lub 12%) наносzono zdenaturowane i odwirowane próbki. Do jednej z wolnych studzienek dodawano również marker mas (*EURX, Perfect Tricolor Protein Ladder*, nr kat.: E3210)). Następnie żele umieszczano w aparacie (BioRad) i prowadzono elektroforezę przy stałym natężeniu prądu (80 mA) do czasu dotarcia czoła barwnika do końca żelu. Po elektroforezie rozdzielone białka przenoszono z żelu na membranę PVDF. Transfer przeprowadzano metodą moką (75 min, stałe napięcie 100V) w aparacie z firmy BioRad.

Po skończonym transferze, ostrożnie, za pomocą pęsety zdejmowano membranę i umieszczano w kasetce zawierającej 5% roztwór mleka w buforze 1x TBST. Kasetkę z membraną umieszczano na kołysce i inkubowano przez co najmniej 45 minut. Po skończonej inkubacji mleko wylewano i przepłukiwano membranę trzy razy po 5 minut w buforze 1x TBST. Po płukaniu, do membrany dodawano roztwór przeciwciał pierwszorzędowych (rozcieńczonych w 1x TBST zgodnie z sugestiami producenta – przeciwciała pierwszorzędowe rozcieńczano w stosunku 1:1000, a drugorzędowe w stosunku 1:5000)

i pozostawiono do inkubacji przez co najmniej godzinę (charakterystyka niektórych przeciwciał sugerowała całonocną inkubację przeciwciał w temperaturze 4° C, co również zostało uwzględnione). Po inkubacji, ponownie przepłukano membranę roztworem 1x TBST, trzy razy po 10 minut. Następnie do membrany dodano roztwór przeciwciał drugorzędowych, rozcieńczonych według sugestii producenta w 1x TBST i inkubowano około godziny. Po inkubacji przepłukano membrany roztworem 1x TBST trzykrotnie po 10 minut i wywołało membrany w aparacie SynGen:GBox. Membranę osuszone, następnie umieszczono na transparentnym podłożu, naniesiono cienką warstwę odczynnika, zawierającego luminol (Advansta, *WesternBright Quantum- HRP Substrate for CCD*, nr kat. K-12042-D10) i inkubowano w ciemnym miejscu przez około dwie minuty. Następnie przykryto membranę transparentną folią i umieszczono w aparacie z odpowiednio ustawionym oprogramowaniem i wywołało. Dane liczbowe do analizy ilościowej białka pozyskano za pomocą programu ImageJ. Poziom badanego białka normalizowano do poziomu białka referencyjnego, tzw. *housekeeping gene*.

# Rozdział 5

## Opis modelu

Translacja białek jest procesem niezwykle istotnym z punktu widzenia regulacji ekspresji genów. Nawet niewielkie odchylenia od normy mogą skutkować niepożądaną kaskadą sygnałową, prowadzącą do nieodwracalnych zmian w komórce. Większość badań eksperymentalnych skupia się często na efekcie regulacji ekspresji (np. poziomy białek, poziomy transkryptu). Wynikające z ograniczeń technicznych braki są w pewien sposób uzupełniane przez modelowanie matematyczne. Modele pozwalają także na sprawdzenie pewnych hipotez *in silico*, które pomagają w późniejszym planowaniu eksperymentów biologicznych.

Zaproponowany w niniejszej pracy model jest modelem translacji pojedynczego transkryptu, umożliwiającym badanie działania konkretnego mikroRNA na target, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i pod wpływem czynnika stresogennego (w tym przypadku promieniowania jonizującego). Sam proces biosyntezy jest modelem opisanym za pomocą maszyn stanowych, natomiast sterowanie modelem jest opisane prostym automatem. Model translacji uwzględnia profile polisomalne badanych transkryptów oraz celujących w nie mikroRNA. W tej rozprawie przeprowadzono symulację procesu translacji dla białek zaangażowanych w ścieżki odpowiedzi na uszkodzenia DNA w wyniku promieniowania X (p53 i PTEN), a także ich transkryptów, z uwzględnieniem regulujących ich mikroRNA – miR-29a i miR-638 [12, 82, 161, 176, 192]. Pomysł wprowadzenia do modelu regulacji oraz koncepcji kombinacji mechanizmów działania mikroRNA został zaczerpnięty z pracy [114], natomiast sposób modelowania oraz wprowadzenie regulacji poprzez promieniowanie jonizujące został zaproponowany przez Autorkę rozprawy.

Zaproponowany model oraz badania eksperymentalne dotyczące wyznaczenia profili polisomalnych dla mRNA oraz mikroRNA, oznaczenia poziomów białek oraz transkryptów po napromieniowaniu, zostały wykonane przez autorkę niniejszej rozprawy. Pozostałe dane eksperymentalne (okresy półtrwania dla mRNA oraz białek oraz poziomy białek i transkryptów po wyciszeniu mikroRNA) pochodzą z literatury bądź zostały zaczerpnięte z założeń przedstawionych w innych pracach badawczych.

## 5.1 Maszyny Stanowe

Skończona maszyna stanowa (FSM – ang. *Finite State Machine*) jest hipotetyczną maszyną obliczeniową, która działa na skończonym zbiorze symboli [8, 185]. Maszyna może znajdować się w jednym z określonej liczby stanów, z jednym stanem początkowym i jednym lub więcej stanów końcowych. Formalnie, definicję FSM przedstawia się za pomocą krotki:  $(Q, \Sigma, T, q_0, F)$ , która zawiera skończony zbiór stanów  $Q$ , skończony zbiór symboli wejściowych  $\Sigma$ , funkcję przejścia  $T: Q \times \Sigma \rightarrow Q$ , stan początkowy  $q_0 \in Q$  oraz zbiór stanów końcowych  $F \subseteq Q$ . Maszynę stanową można sobie wyobrazić jako taśmę podzieloną na nieskończenie wiele segmentów, z symbolami wejściowymi wewnątrz tych segmentów. Głowica maszyny porusza się po tej taśmie zgodnie z regułami przejścia, zadanymi przez użytkownika. Kluczowe jest utworzenie skończonego zbioru reguł przejścia, opartych na obecnym stanie maszyny i obecnym symbolu na taśmie. W każdym przejściu maszyna może przesunąć się o jedno pole w prawo lub w lewo, pozostać w tym samym miejscu lub zakończyć działanie w przypadku stanu końcowego. Typowa reguła przejścia w maszynie stanowej zawiera trzy podstawowe elementy:

1. Stan poprzedni: określa stan, w którym znajduje się maszyna przed wykonaniem przejścia.
2. Sygnał wejściowy: reprezentuje sygnał, który jest odebrany przez maszynę i wpływa na decyzję o przejściu do innego stanu. Sygnały mogą przyjmować różne formy, takie jak wartość logiczna, sygnał binarny, dane wejściowe, czy nawet zewnętrzne bodźce.
3. Stan następny: określa stan, do którego maszyna przechodzi po wykonaniu przejścia. Jest to nowy stan, który maszyna przyjmie po uwzględnieniu sygnału wejściowego.

ściowego, zgodnie ze zdefiniowanymi regułami.

Jeżeli nie ma odpowiedniej reguły przejścia, maszyna może się „zawiesić” i niekontrolowanie kontynuować obliczenia.

Jednym z najpopularniejszych sposobów przedstawienia maszyny stanowej jest diagram przejść stanów, który obrazuje zależności między stanami i symbolami przy użyciu graficznej reprezentacji.

Reguły przejścia można przedstawić w różny sposób, w zależności od używanej notacji. Na przykład, w diagramie przejść stanów reguły przejścia są reprezentowane jako strzałki między stanami, a etykiety na strzałkach opisują warunki, które muszą być spełnione, aby przejście miało miejsce. W innych notacjach, takich jak tabele stanów lub funkcje przejścia, reguły przejścia są przedstawiane w formie tabeli lub listy, które precyzują zależności między stanami i sygnałami wejściowymi.

Istnieje wiele odmian maszyn stanowych, od niedeterministycznych, przez wielotaśmowe i wielogłowicowe, po „reakcyjne” warianty automatów skończonych.

## 5.2 Opis modelu

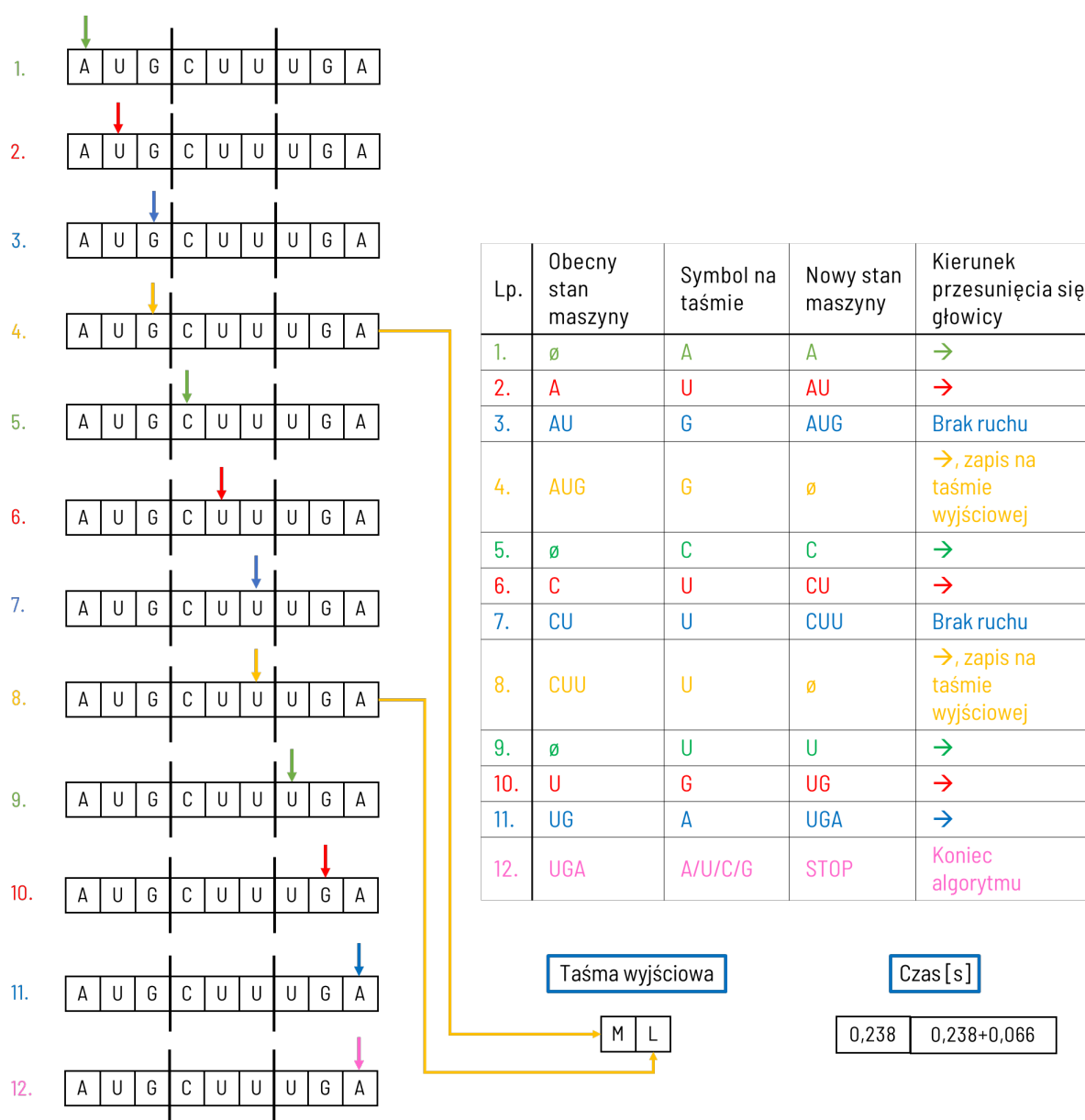
### 5.2.1 Translacja

Model translacji jest modelem opartym na maszynach stanowych. Porównując opis maszyny stanowej do procesu translacji białek, można zauważyć wiele analogii. Taśma oraz głowica są odpowiednikami, odpowiednio, mRNA oraz rybosomu, natomiast symbole na taśmie odzwierciedlają sekwencję nukleotydów. Stany maszyny można porównać do procesu dekodowania kodonów przez rybosom, a taśma wyjściowa to powstający łańcuch aminokwasowy.

Algorytm translacji przebiega według zadanego przez użytkownika zbioru reguł. W tym przypadku zbiorami reguł są instrukcje, jak dekodować łańcuch aminokwasowy. Na podstawie obecnego stanu maszyny oraz informacji, jaki nukleotyd jest kolejny w sekwencji, algorytm decyduje, jaki aminokwas jest syntezowany, zapisuje symbol aminokwasu na taśmie wyjściowej oraz odczytuje z podanego przez użytkownika wektora czas przyłączenia się tRNA do mRNA (czasy te są następnie ze sobą sumowane). Ponadto algorytm wyróżnia trzy kodony STOP, które są sygnałem do zakończenia algorytmu,

oraz jeden kodon START, rozpoczynający działanie maszyny. Umożliwia to podawanie sekwencji dłuższych niż sama część kodująca, bez obawy, że algorytm przetłumaczy niekodującą część mRNA. Cała tabela przejść została przedstawiona w tabeli 8.1, natomiast porównanie elementów maszyny stanowej z procesem translacji przedstawia tabela 5.2. Aby pomóc w zrozumieniu działania algorytmu, przygotowano prosty schemat działania maszyny na przykładzie translacji krótkiego, trzyaminokwasowego łańcucha, wraz z tabelą przejść oraz czasami przyłączenia się poszczególnych tRNA (rysunek 5.1).

Czasy przyłączania się tRNA do mRNA zostały oszacowane na podstawie prac [36, 46]. Z publikacji [36] zaczerpnięto czasy przyłączania się tRNA do mRNA, jednak ze względu na fakt, iż czasy te były oszacowane dla bakterii, przeskalowano te czasy, posilując się pracą [46]. W przedstawionej pracy, porównano czasy przyłączania się tRNA w bakteriach oraz eukariotach (w jednostkach arbitralnych) oraz zestawiono wyniki w formie tabeli. Policzono stosunek wartości czasów pomiędzy bakteriami, a komórkami eukariotycznymi dla każdego kodonu i wymnożono czasy z pracy [36] z wyliczonymi stosunkami czasów dla każdego tRNA. Wyliczone czasy zostały przedstawione w tabeli 5.1.



Rysunek 5.1: Przykładowy schemat działania maszyny stanowej przedstawiony dla trzech aminokwasów. Po lewej stronie przedstawiono fragment łańcucha. Strzałki nad poszczególnymi segmentami przedstawiają położenie głowicy (a dokładnie – miejsca wiążącego w rybosomie). Kolory strzałek oraz numery korespondują z tabelą przejść przedstawioną po prawej stronie.

Tablica 5.1: Tabela kodonów oraz odpowiadających im czasom przyłączania się tRNA. Czerwonym kolorem zaznaczono kodony STOP.

Kodon	Średni czas przyłączenia wg [36] [ms]	Czas translacji u eukariotów ( $T_e$ ) [46]	Czas translacji u prokariotów ( $T_p$ ) [46]	$T_e/T_p$	Wyliczony czas [s]
UUU	136	62,2	123,5	0,503	0,270
UUC	195	27,3	126,6	0,215	0,904
UUG	50	22,3	24,8	0,899	0,055
UUA	157	39	185,2	0,210	0,745
UCU	55	24,8	73,5	0,337	0,163
UCC	246	34,5	149,3	0,231	1,06
UCG	96	139,3	80,6	1,728	0,055
UCA	106	91	222,2	0,409	0,258
UGU	75	155,5	129,9	1,197	0,062
UGC	109	68,3	59,2	1,153	0,094
UGG	168	45,5	68,5	0,664	0,252
UGA	12	294,1	294,1	1	0,012
UAU	53	77,7	79,4	0,978	0,054
UAC	77	34,1	53,2	0,640	0,120
UAG	19	1	1	1	0,019
UAA	11	1	1	1	0,011
CUU	260	621,9	158,7	3,918	0,066
CUC	204	273	120,5	2,265	0,090
CUG	35	284,4	12,6	22,57	0,001
CUA	286	91	2000	0,045	6,285
CCU	143	136,5	101	1,351	0,105
CCC	197	189,6	188,7	1,004	0,196
CCG	134	85,3	56,2	1,517	0,088
CCA	237	27,3	5000	0,0054	43,406
CGU	28	45,5	24,8	1,834	0,015
CGC	35	63,2	36,6	1,726	0,020
CGG	397	273	101	2,702	0,146
CGA	34	1365	163,9	8,328	0,004
CAU	296	88,8	256,4	0,346	0,854
CAC	222	39	166,7	0,233	0,948
CAG	231	70,4	73,5	0,957	0,241
CAA	179	30,3	84,7	0,357	0,500
GUU	26	19,5	50,8	0,383	0,0677
GUC	208	27,1	112,4	0,241	0,862
GUG	42	103,4	35,6	2,904	0,014
GUA	73	136,4	84,7	1,610	0,045
GCU	39	24,8	89,3	0,277	0,140
GCC	415	34,5	105,3	0,327	1,266
GCG	44	170,6	40,8	4,181	0,01
GCA	83	54,6	67,6	0,807	0,102
GGU	35	38,9	32,5	1,196	0,029
GGC	49	17,1	27,2	0,628	0,077
GGG	81	92,2	52,1	1,769	0,045



GGA	324	91	71,9	1,265	0,255
GAU	77	38,9	42,9	0,906	0,084
GAC	116	17,1	71,9	0,237	0,487
GAG	36	42,1	84	0,501	0,0718
GAA	57	19,5	16,3	1,196	0,0476
AUU	97	21	29	0,724	0,133
AUC	128	29,2	64,9	0,449	0,284
AUG	266	27,3	24,5	1,114	0,238
AUA	128	136,4	204,1	0,668	0,191
ACU	55	24,8	106,4	0,233	0,235
ACC	153	34,5	74,6	0,462	0,330
ACG	129	119,7	66,2	1,808	0,071
ACA	178	68,2	303	0,225	0,790
AGU	85	310,9	129,9	2,393	0,035
AGC	127	136,5	70,9	1,925	0,065
AGG	461	60,4	153,8	0,392	1,173
AGA	190	24,8	74,6	0,332	0,571
AAU	109	62,2	119	0,522	0,208
AAC	161	27,3	99	0,275	0,583
AAG	102	16,8	140,8	0,119	0,854
AAA	76	369	44,2	8,348	0,009

Tablica 5.2: Znaczenie symboli opisujących maszyny stanowe i ich biologiczne analogi w modelu translacji

Symbol	Znaczenie	Biologiczny analog
Q	Zbiór wszystkich stanów maszyny	Symbole kodonów na każdym etapie odkodowania (np. A, AU, AUG, C, CU, CUA, itp.) + symbol pusty $\emptyset$ , który jest przybierany za każdym razem po zapisaniu aminokwasu na nowej taśmie
$\Gamma$	Zbiór symboli z taśmy wyjściowej	Symbole aminokwasów + STOP
$\Sigma$	Zbiór symboli z taśmy wejściowej	Symbole nukleotydów (A, U, G, C)
b	Symbol pusty należący do zbioru $\Gamma$	$\emptyset$
q <sub>0</sub>	Stan początkowy maszyny	AUG (kodon START)
F	Zbiór stanów końcowych maszyny	STOP ( w przypadku przyjęcia stanów UAA, UAG, UGA)
( $\delta$ )	Funkcja przejścia ( $\leftarrow$ – w lewo; $\rightarrow$ – w prawo; $\circ$ – brak ruchu)	Rybosom przesuwa się tylko w jedną stronę (założono, że od strony lewej do prawej), ewentualnie może się zatrzymać

### 5.2.2 Automat

Działanie modelu rozpoczyna się od wygenerowania macierzy kombinacji dla czterech wybranych mechanizmów regulacji translacji przez mikroRNA,  $M = \{M1, M2, M3, M4\}$ . Zostały subiektywnie wybrane cztery mechanizmy:

1. M1. inhibicja inicjacji translacji,
2. M2. inhibicja elongacji translacji,
3. M3. przedwczesne odłączenie się rybosomów,
4. M4. degradacja mRNA.

Każdy z powyższych mechanizmów może oddziaływać w określonym spektrum siły o zakresach od 0 do 100% z krokiem 25%. Wygenerowano łącznie 625 ( $5^4$ ) kombinacji, począwszy od  $\{0\%, 0\%, 0\%, 0\%\}$ , co oznacza brak jakiegokolwiek regulacji, kończąc na  $\{100\%, 100\%, 100\%, 100\%\}$ , co oznacza, że wszystkie mechanizmy są aktywne i działają z pełną mocą.

Następnie wybierany jest profil polisomalny RNA oraz mikroRNA odpowiedni dla symulacji (dla kontroli lub po promieniowaniu). Następnie, z rozkładu polisomalnego mRNA, losowana jest liczba rybosomów (wykonano 200 losowań). Dla wylosowanej liczby rybosomów na mRNA prowadzona jest symulacja (w przypadku symulacji dla 4h, prowadzona jest symulacja od zerowej do czwartej godziny, a dla symulacji 12h, prowadzona jest symulacja od czwartej do dwunastej godziny). W zależności od wylosowanej liczby rybosomów, symulacja jest prowadzona dla konkretnej frakcji (zgodnie z podziałem wymienionym poniżej, jako dane wejściowe symulacji wybierane są udziały przydzielonej frakcji dla mRNA oraz mikroRNA). Należało jednak wprowadzić pewne założenia i ograniczenia. Przede wszystkim należy sprawdzić, ile rybosomów jest w stanie pomieścić badany transkrypt. Założono, że pojemność transkryptu będzie mierzona wyłącznie na podstawie długości sekwencji kodującej (założenie przyjęte arbitralnie). Do obliczenia maksymalnej liczby zajętości transkryptu przez rybosom, zastosowano następujący wzór:

$$MAX_{RIBOSOME} = \frac{ORF_{kod_{length}}}{30} \quad (5.1)$$

gdzie  $ORF_{kod_{length}}$  oznacza długość sekwencji kodującej (wyrażanej w liczbie nukleotydów), a liczba 30 wskazuje na liczbę nukleotydów, które pokrywa pojedynczy rybosom [15]. Ograniczenie te jest jednak istotne wyłącznie w przypadku krótkich transkryptów, ponieważ w pracy [4] wykazano, że, niezależnie od długości transkryptu, w eukariotach nie zaobserwowano więcej niż 15 rybosomów przyłączonych do mRNA. W związku z powyższym, frakcje polisomalne podzielono w sposób przedstawiony w tabeli 5.3.

Tablica 5.3: Podział rybosomów na frakcje.

Frakcja	liczba rybosomów
Wolne mRNA i mała podjednostka rybosomalna	brak rybosomu
Duża podjednostka rybosomalna i monosom	jeden rybosom (ze względu na zbyt słabą rozdzielczość widm dla polisomów uzyskanych w eksperymentach, niemożliwym było rozdzielanie dużej podjednostki od monosomu. Autorka rozprawy założyła, że cała frakcja należy do monosomu).
Lekkie polisomy	od 2-8 rybosomów
Ciężkie polisomy	powyżej 9 rybosomów

Ponieważ losowanie odbywa się w zakresie wartości (0-1), dla każdej frakcji, która ma więcej niż jeden możliwy wybór liczby rybosomów, podzielono udział (zamieniony z wartości procentowych na wartości liczbowe) na liczbę rybosomów znajdujących się w danej frakcji. Dla przykładu, jeżeli w lekkich polisomach udział frakcji wyniesie 0.21, to wartość ta jest dzielona dla siedmiu rybosomów występujących wewnątrz tej frakcji. Założono jednakowy udział dla każdej liczby rybosomów wewnątrz frakcji.

Tablica 5.4: Przykładowa tabela opisująca losowanie liczby rybosomów z zadanego profilu polisomalnego.

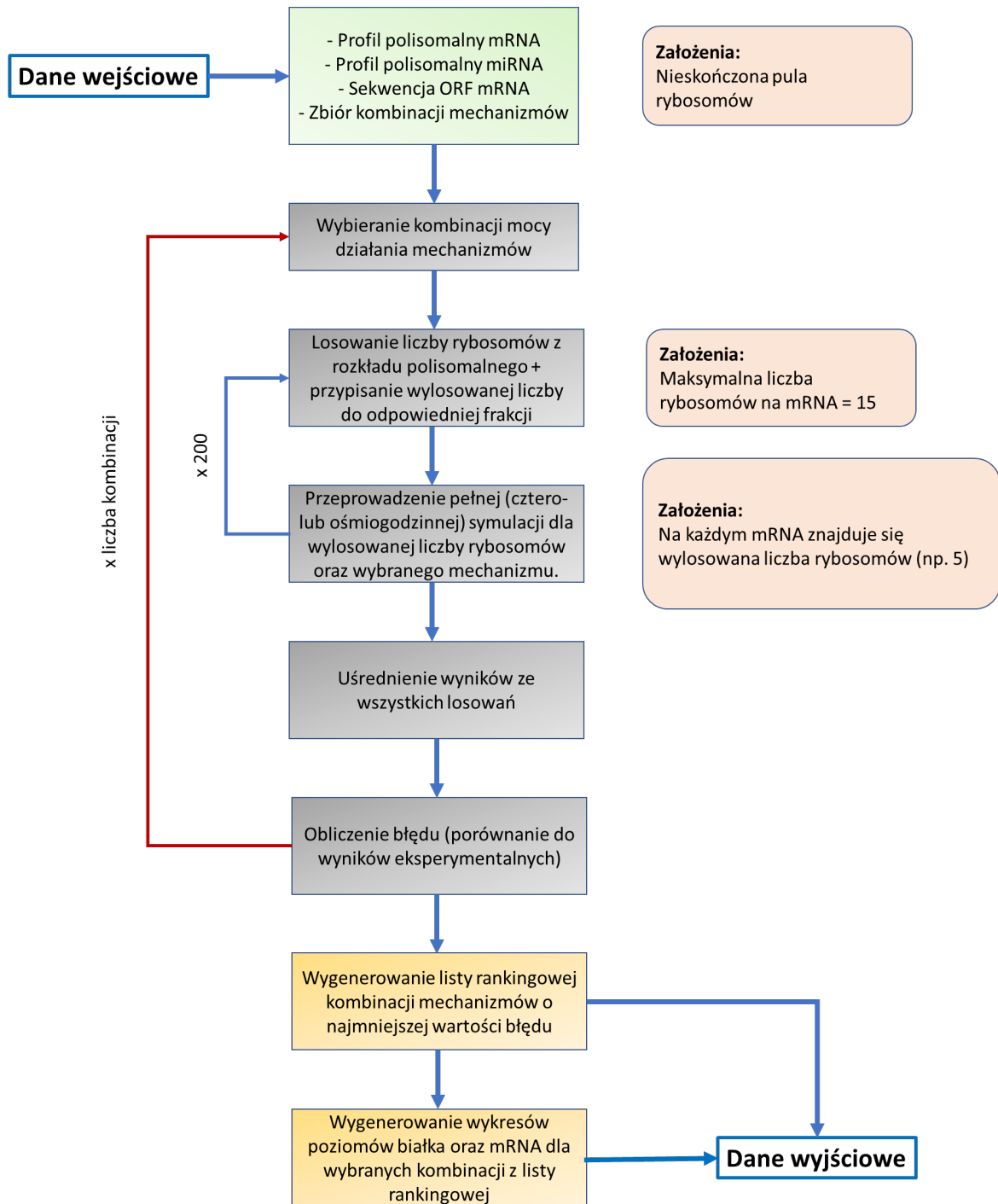
I. rybosomów	Udział	Zakresy wylosowanych wartości	Suma dla frakcji
0	0.16	$\langle 0-0.16 \rangle$	0.16
1	0.35	$(0.16-0.51)$	0.35
2	0.03	$(0.51, 0.54)$	0.35
3	0.03	$(0.54-0.57)$	0.35
4	0.03	$(0.57-0.6)$	0.35
5	0.03	$(0.6-0.63)$	0.35
6	0.03	$(0.63-0.66)$	0.35
7	0.03	$(0.66-0.69)$	0.35
8	0.03	$(0.69-0.72)$	0.21
9	0.04	$(0.72-0.76)$	0.21
10	0.04	$(0.76-0.80)$	0.21
11	0.04	$((0.80- 0.84)$	0.21
12	0.04	$(0.84-0.88)$	0.21
13	0.04	$(0.88-0.92)$	0.21
14	0.04	$(0.92-0.96)$	0.21
15	0.04	$(0.96-1)$	0.28

Dla łatwiejszego zrozumienia powyższego opisu, tablica 5.4 przedstawia, jak zostały

wybierane rybosomy wewnątrz frakcji mRNA dla fikcyjnych danych eksperymentalnych dla profilu o następujących wartościach: {0.16; 0.35; 0.21; 0.28}.

Po wylosowaniu liczby rybosomów, prowadzona jest symulacja tylko dla tej wylosowanej liczby (czyli jak została wylosowana liczba 4, to cała symulacja jest prowadzona dla transkryptów z czterema rybosomami i dla frakcji *lekkie polisomy*). Translacja była prowadzona zgodnie z opisem zawartym w podrozdziale 5.2.1.

Po zakończeniu translacji, generowana jest wartość  $t_{białko}$ , określająca czas (w sekundach) pomiędzy powstaniem poprzedniego i obecnie powstającego białka. Jeżeli w układzie występuje więcej niż jeden rybosom, translacja rozpoczyna się w równych odstępach między sobą (liczba nukleotydów kodujących białko jest dzielona przez liczbę rybosomów w układzie i po przesunięciu się rybosomu o określoną liczbę nukleotydów, przyłącza się kolejny rybosom). W przypadku frakcji monosomu, kolejna translacja rozpoczyna się natychmiast po zakończeniu poprzedniej. Czas  $t_{białko}$  jest kumulowany, w miarę nowo powstających kolejnych białek. Symulacja trwa do osiągnięcia założonego czasu końcowego (4 albo 8 godzin). Następnie losowana jest kolejna liczba rybosomów i cykl rozpoczyna się od początku. Całkowite białko wytworzone w wylosowanej konfiguracji zostało obliczone przez pomnożenie powstającego w czasie białka przez liczbę transkryptów poddanych aktywnej translacji (czyli takich, które miały w układzie co najmniej jeden rybosom). Całkowity wynik symulacji jest uśrednionym przebiegiem czasowym poziomów białka i transkryptu ze wszystkich iteracji w obrębie symulowanej kombinacji mocy działania poszczególnych mechanizmów. W celu lepszego zrozumienia działania automatu, uproszczony schemat działania przedstawiono na rysunku 5.2.



Rysunek 5.2: Uproszczony schemat działania modelu translacji.

Ze względu na konieczność wprowadzenia do układu takich parametrów jak transkrypcja i degradacja mRNA oraz degradacja białek, oszacowano te parametry na podstawie danych literaturowych i przedstawiono w tabeli 5.5. W przypadku niezalezienia odpowiednich informacji, parametry zostały założone przez Autorkę na podstawie zdobytej wiedzy na temat badanych molekuł.

Tablica 5.5: Tabela przedstawiająca zaproponowane współczynniki degradacji transkryptów oraz białek.

Transkrypt lub Białko	Okres pół-trwania – kontrola	$k_{deg}$	Źródło literaturowe	Okres pół-trwania po napromieniowaniu	$k_{deg}$	Źródło literaturowe
p53 <sub>t</sub>	10 h	$1,925 \cdot 10^{-5}$	[154]	12 h	$1,6 \cdot 10^{-5}$	brak
p53 <sub>p</sub>	30 min.	$3,85 \cdot 10^{-4}$	[10]	45min	$2,56 \cdot 10^{-4}$	[184]
Bax <sub>t</sub>	1,3 h	$1,48 \cdot 10^{-4}$	[99]	3 h	$6,41 \cdot 10^{-5}$	[99]
Bax <sub>p</sub>	5 h	$3,85 \cdot 10^{-5}$	[126]	6 h	$3,85 \cdot 10^{-5}$	Brak
PTEN <sub>t</sub>	4,5 h	$4,27 \cdot 10^{-5}$	[186]	4,5 h	$4,27 \cdot 10^{-5}$	[33]
PTEN <sub>p</sub>	7 h	$2,75 \cdot 10^{-5}$	[59, 165]	7 h	$2,75 \cdot 10^{-5}$	Brak

### 5.2.3 Wybrane mechanizmy regulacji translacji

Regulacja z wykorzystaniem mikroRNA została wprowadzona poprzez modyfikację modelu podstawowego opisanego w poprzednim podrozdziale. Poniżej znajdują się opisy modyfikacji modelu ze względu na wykorzystywany mechanizm.

#### 1. Regulacja poprzez wydłużenie czasu inicjacji translacji

W zależności od mocy oddziaływania mikroRNA, do stałej określającej czas inicjacji została dodana kolejna wartość stała, określająca opóźnienie inicjacji (założono maksymalne opóźnienie 5 minut; dane literaturowe donoszą o „kilkuminutowym opóźnieniu” [175]).

## 2. Regulacja poprzez wydłużenie czasu elongacji

Każdy czas dostarczenia antykodonu przez tRNA jest indywidualny. Czas elongacji zostaje wydłużony w zależności od siły oddziaływania mechanizmu (literatura podaje 2-3-krotnie spowolnioną elongację, więc założono 2.5-krotne spowolnienie) [98, 120, 127].

## 3. Regulacja poprzez przedwczesne odłączenie się rybosomu

Ten mechanizm jest bardziej skomplikowany od pozostałych. Wprowadzono w nim instrukcje warunkowe sprawdzające, czy w dany momencie można „odłączyć” rybosom. W wariancie bez regulacji, mechanizm ten nie występuje, natomiast przy stuprocentowej wydajności mechanizmu, co drugi rybosom nie wyprodukuje kompletnego białka [63, 127]. Oznacza to, że w przypadku 75% mocy oddziaływania mechanizmu, odłączony będzie co trzeci rybosom, w przypadku 50%, co czwarty, a przy 25% - co ósmy. W modelu rybosomy odłączają się w sposób deterministyczny.

## 4. Regulacja poprzez degradację mRNA

Do fragmentu zmiennej  $mRNA_{deg}$  odpowiedzialnego za degradację mRNA, dodany jest człon, zwiększający tempo degradacji mRNA za pośrednictwem mikroRNA.

$$mRNA_{deg} = k_{deg} \cdot mRNA_{total}(end) + k_{deg} \cdot n_{mir} \cdot M(4) \cdot miRNA_{profil} \cdot mRNA_{total}(end) \quad (5.2)$$

gdzie  $k_{deg}$  jest stałą degradacji danego mRNA, której wartość pochodzi z literatury,  $mRNA_{total}$  oznacza całkowitą ilość mRNA w danej chwili czasu,  $n_{mir}$  oznacza stosunek całkowitych ilości mikroRNA do całkowitego mRNA. W przypadku symulowania w warunkach kontrolnych, arbitralnie przyjęto, że stosunek ten wynosi 1. Podczas symulacji przypadku po napromieniowaniu, jako dane wejściowe do modelu podawane są poziomy ekspresji liczone względem kontroli.  $miRNA_{profil}$  jest wartością liczbową udziału procentowego mikroRNA w badanej frakcji.

Należy mieć na uwadze, że takie sytuacje mają miejsce tylko wtedy, kiedy w danej frakcji wystąpiło 100% mikroRNA oraz 100% mRNA. W innym przypadku do każdego

mechanizmu doliczony jest iloczyn mocy oddziaływania oraz udziału procentowego mikroRNA w danej frakcji.

Przeprowadzono trzy symulacje: dla kontroli (symulacja ta prowadzona była aż do osiągnięcia stanu ustalonego zarówno dla mRNA jak i białka), dla czasu 0–4 godzin od napromieniowania oraz 4–12 godzin od napromieniowania. Po każdej symulacji generowano tabelę rankingową, na podstawie której określano warunki początkowe do kolejnej symulacji – wartością początkową białka oraz mRNA dla kolejnej symulacji była wartość końcowa symulacji z najlepiej dopasowanego mechanizmu z poprzedniej symulacji (dla kontroli założono wartości początkowe  $mRNA(0) = 1$  i  $białko(0) = 0$ ).

#### 5.2.4 Tworzenie tabeli rankingowej

Tabele rankingowe generowane są na podstawie porównania wyników uzyskanych w symulacji (brane są ostatnie wartości z symulacji) do wyników otrzymanych w ramach autorskich badań eksperymentalnych, bądź wyników eksperymentalnych wziętych z literatury.

Założono, że przebieg symulacji bez obecności żadnych mechanizmów będzie wartością wyjściową i będzie się odnosić do poziomu transkryptu oraz białka po wyciszeniu mikroRNA. Wzięte z literatury względne poziomy ekspresji zarówno mRNA jak i białka w obecności mikroRNA (w porównaniu do poziomów z symulacji po wyciszeniu mikroRNA) zostały przyjęte jako poziomy w warunkach kontrolnych.

W celu wyliczenia stosunku poziomów białka oraz mRNA z symulacji względem danych biologicznych, należało najpierw obliczyć stosunek poziomu mRNA lub białka dla konkretnego mechanizmu regulacji do poziomu mRNA lub białka bez żadnego aktywnego mechanizmu. Następnie wyliczono sumę modułów, w których zostały przyrównane wartości z równań 5.3, 5.4) do względnej ekspresji z badań eksperymentalnych (równanie 5.5).



$$\delta_{mRNA} = \frac{\text{poziom\_mRNA\_z\_konkretnego\_mechanizmu}}{\text{poziom\_mRNA\_bez\_zadnego\_mechanizmu}} \quad (5.3)$$

$$\delta_{białko} = \frac{\text{poziom\_białko\_z\_konkretnego\_mechanizmu}}{\text{poziom\_białko\_bez\_zadnego\_mechanizmu}} \quad (5.4)$$

$$\Delta = \left| \frac{\delta_{mRNA}}{\text{względna\_ekspresja\_mRNA}} - 1 \right| + \left| \frac{\delta_{białko}}{\text{względna\_ekspresja\_białko}} - 1 \right| \quad (5.5)$$

Przykładowa pełna lista rankingowa została umieszczona w Suplemencie (Tabela 8.2). Dostęp do wszystkich list rankingowych dostępny jest pod poniższymi odnośnikami:

[https://cellab.polsl.pl/download/lista\\_rankingowa\\_PTEN\\_miR638.xlsx](https://cellab.polsl.pl/download/lista_rankingowa_PTEN_miR638.xlsx)

[https://cellab.polsl.pl/download/lista\\_rankingowa\\_PTEN\\_mir29a.xlsx](https://cellab.polsl.pl/download/lista_rankingowa_PTEN_mir29a.xlsx)

[https://cellab.polsl.pl/download/lista\\_rankingowa\\_P53\\_miR638.xlsx](https://cellab.polsl.pl/download/lista_rankingowa_P53_miR638.xlsx)

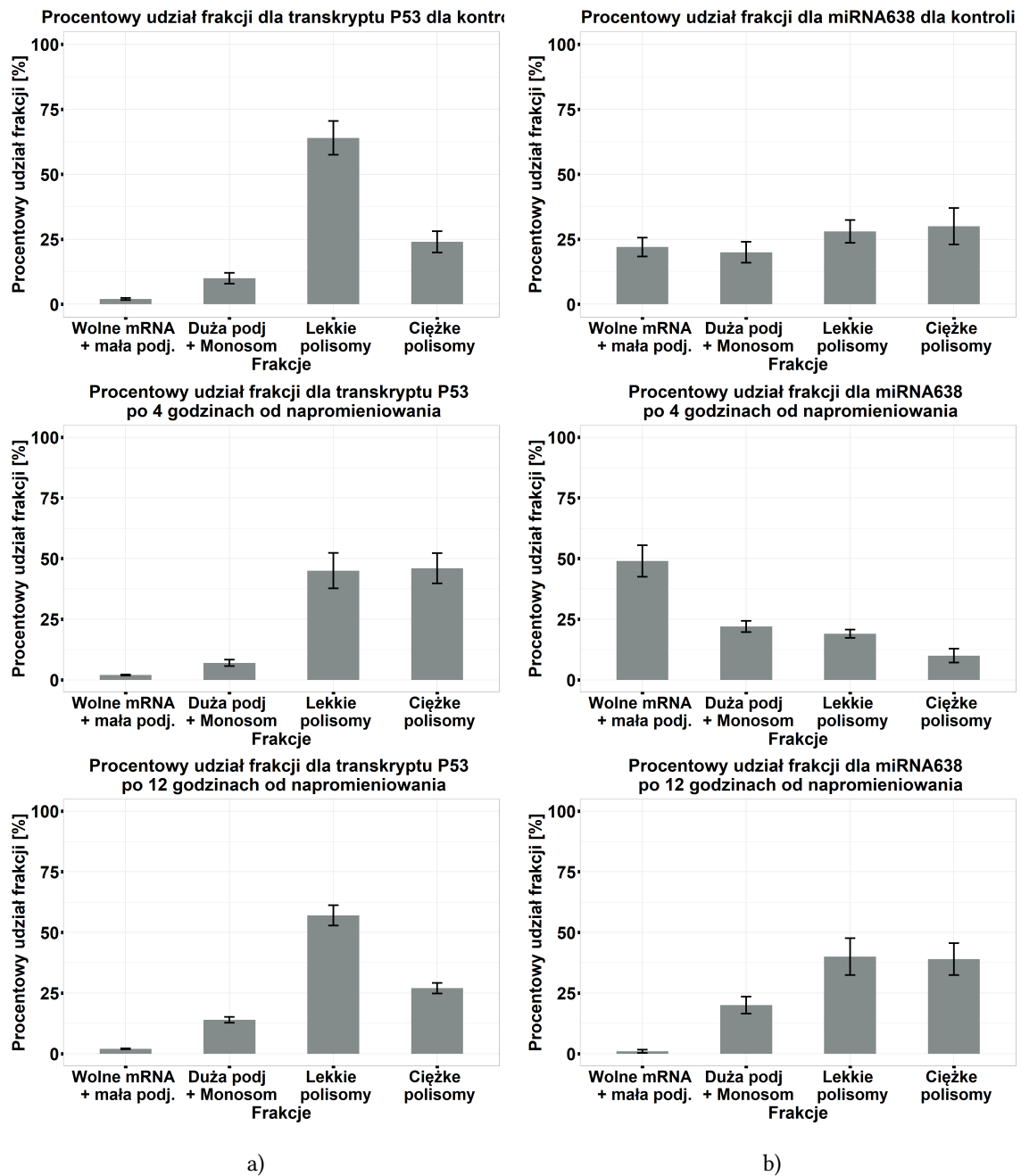


# Rozdział 6

## Wyniki

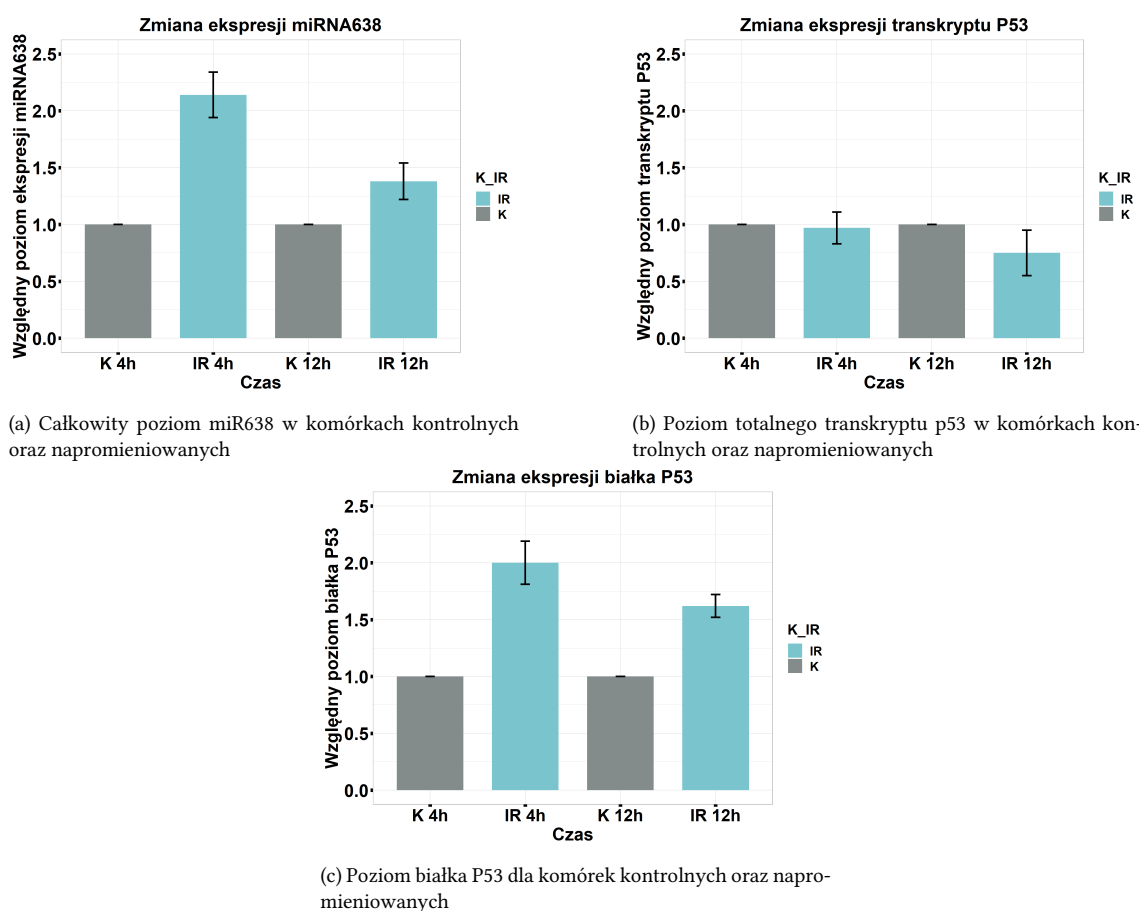
### 6.1 Wyniki biologiczne

Wyniki przedstawione w niniejszym rozdziale zostały otrzymane w ramach eksperymentów, przeprowadzonych przez Autorkę rozprawy. Obejmują one udziały frakcji polisomalnych w obrębie badanego transkryptu oraz mikroRNA, a także poziomy ekspresji dla totalnego białka, transkryptu oraz mikroRNA. Wszystkie analizy zostały przeprowadzone zgodnie z dostępnymi w literaturze protokołami [96, 124, 162].



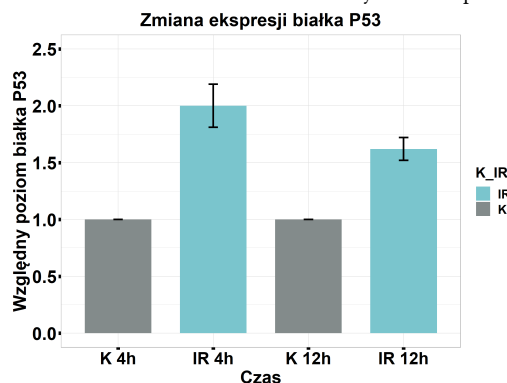
Rysunek 6.1: Porównanie udziałów frakcji dla transkryptu p53 (a) oraz miR638 (b) w warunkach kontrolnych oraz po napromieniowaniu w dawce 4 Gy.

Przedstawione wykresy wskazują na aktywną odpowiedź na promieniowanie zarówno w przypadku p53 jak i mikroRNA [52, 89, 122, 159]. W warunkach kontrolnych,



(a) Całkowity poziom miR638 w komórkach kontrolnych oraz napromieniowanych

(b) Poziom całkowitego transkryptu p53 w komórkach kontrolnych oraz napromieniowanych



(c) Poziom białka P53 dla komórek kontrolnych oraz napromieniowanych

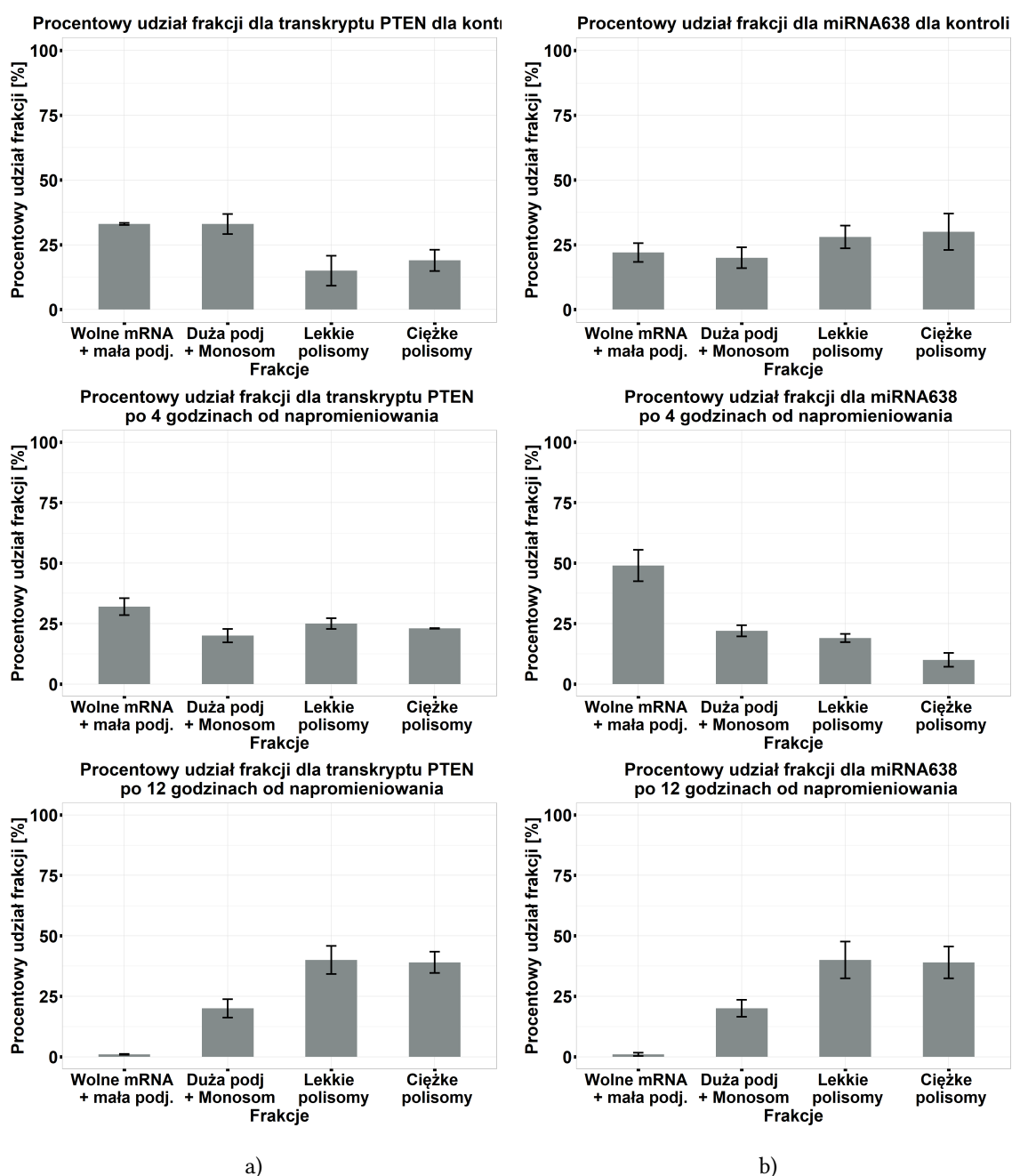
Rysunek 6.2: Poziomy ekspresji dla całkowitego miR638 (a) oraz transkryptu (b) i białka (c) P53.

rozkład polisomów dla p53 wyraźnie wskazuje na kumulację we frakcji lekkich polisomów, natomiast cztery godziny od napromieniowania, frakcje przesunęły się w kierunku frakcji ciężkich, co świadczy o zwiększonej wydajności translacji [40]. Znajduje to swoje odzwierciedlenie w poziomie całkowitego białka p53 (rysunek 6.2c). Po upływie dwunastu godzin, wyraźnie można zaobserwować, że rozkład polisomów zaczyna wracać do rozkładu obserwowanego w kontroli (rysunek 6.1), a całkowity poziom białka zaczyna spadać. Co interesujące, nie zaobserwowano wzrostu poziomu transkryptu p53 (rysunek 6.2b).

Analizując rozkład polisomalny w miR638, można zaobserwować równomierny rozkład w warunkach kontrolnych. Pod wpływem promieniowania, po czterech godzinach zaczęła dominować frakcja wolnych mRNA/mała podjednostka rybosomu, natomiast po

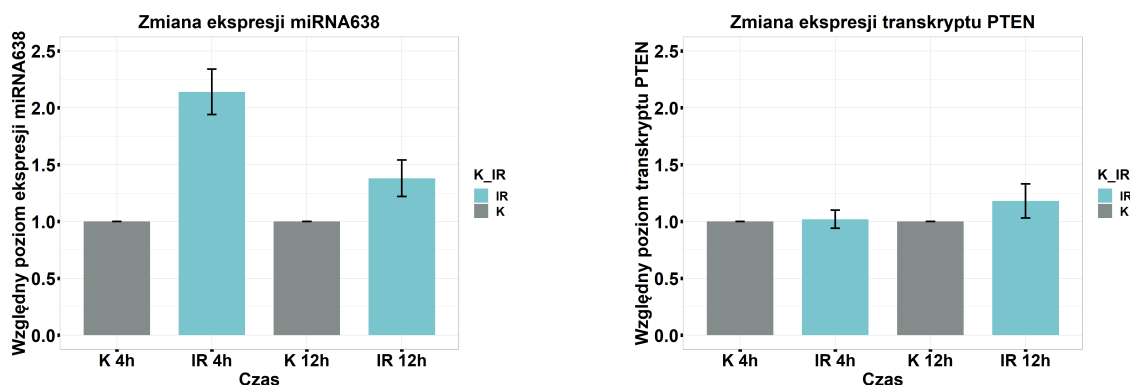
upływie dwunastu godzin, udział polisomów przesunął się w stronę lekkich i ciężkich frakcji (rysunek 6.1). Analizując całkowity poziom miR638, można zauważyć dwukrotny wzrost ekspresji po czterech godzinach od napromieniowania względem kontroli, natomiast po dwunastu godzinach, poziom ten tylko nieznacznie się obniżył (rysunek 6.4a). Oznacza to, że miR638 jest aktywnie zaangażowanym mikroRNA w procesy naprawcze, co znajduje potwierdzenie w literaturze [52].

Porównując ze sobą zarówno całkowite poziomy ekspresji, jak i profile polisomalne, można zauważyć, że po czterech godzinach po napromieniowaniu, mikroRNA we frakcjach ciężkich i lekkich (czyli wydajnie ulegających translacji) wykazuje niski procent udziałów, pozwalając tym samym na wydajniejszą translację białka p53, którego główne udziały przypadają właśnie na te frakcje, pomimo zwiększonej całkowitej ekspresji tego mikroRNA. Po dwunastu godzinach ta proporcja się zmienia, wykazując tym samym większy wpływ na zahamowanie ekspresji białka p53.



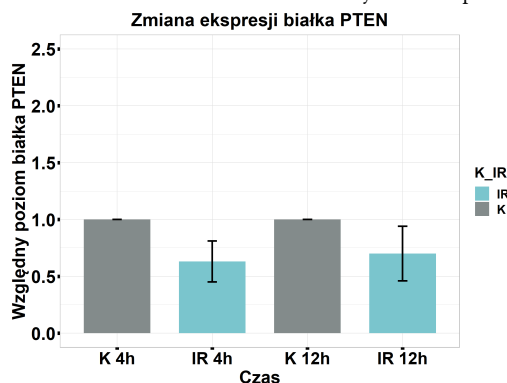
Rysunek 6.3: Porównanie udziałów frakcji dla transkryptu PTEN (a) oraz miR638 (b) w warunkach kontrolnych oraz po napromieniowaniu w dawce 4 Gy.

Białko PTEN, mimo udowodnionych funkcji w ścieżce apoptozy, nie wykazuje szczególnej aktywności pod wpływem promieniowania. Według pracy [107], białko PTEN



(a) Całkowity poziom miR638 w komórkach kontrolnych oraz napromieniowanych

(b) Poziom całkowitego transkryptu PTEN w komórkach kontrolnych oraz napromieniowanych



(c) Poziom białka PTEN dla komórek kontrolnych oraz napromieniowanych

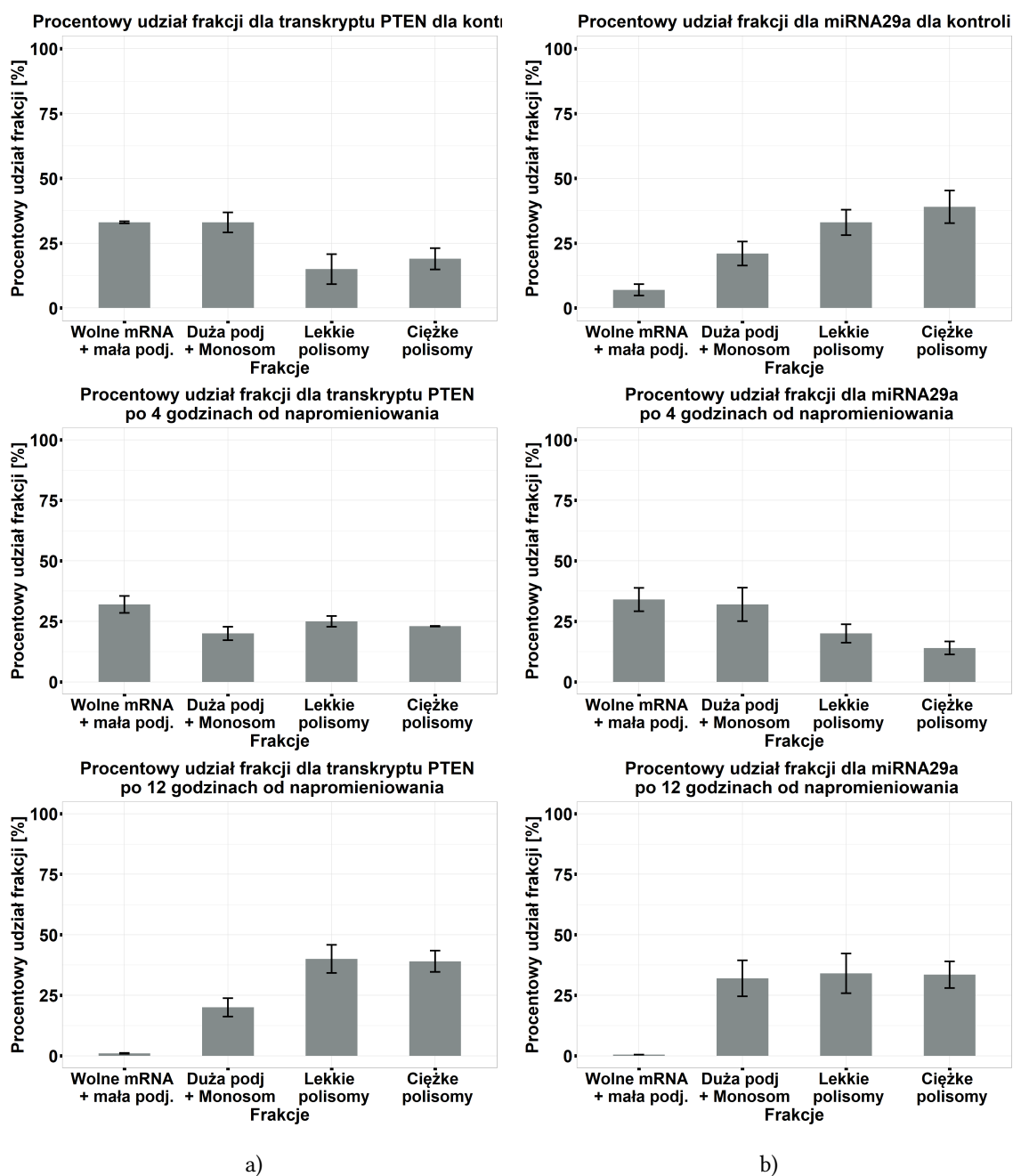
Rysunek 6.4: Eksperymentalnie zmierzone całkowite poziomy ekspresji dla miR638 oraz transkryptu i białka PTEN.

zwiększa przeżycie komórek i ogranicza naprawę DNA, co może prowadzić do niestabilności genomu i zagrażać efektywnej terapii. W komórkach HCT116 wyraźnie poziom białka PTEN spadł (o około 30%), co pozwala wnioskować, że produkcja PTENU została celowo zahamowana, aby naprawa DNA przebiegła wydajniej. Porównując profile polisomalne transkryptu PTEN oraz miR638, w kontroli, udziały frakcji są wyrównane i podobne. Po czterech godzinach udział frakcji wydajnie translatujących w PTENie się zwiększa, natomiast w miR638 jest obserwowana odwrotna zależność. Po dwunastu godzinach profile PTENU i miR638 są niemal identyczne. Podobnie jak w przypadku transkryptu p53, poziom mRNA PTENU nie zmienia się względem kontroli (po dwunastu godzinach obserwowany jest niewielki wzrost poziomu mRNA).

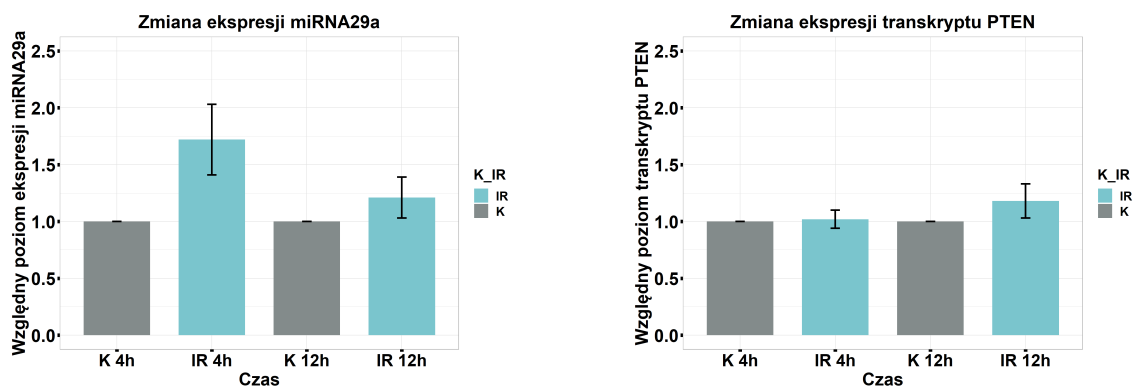
Powiązanie pomiędzy miR638 a PTEN nie zostało zbyt szeroko opisane. Tylko jedna



publikacja wskazuje na teoretyczne powiązanie mikroRNA-target - [161].

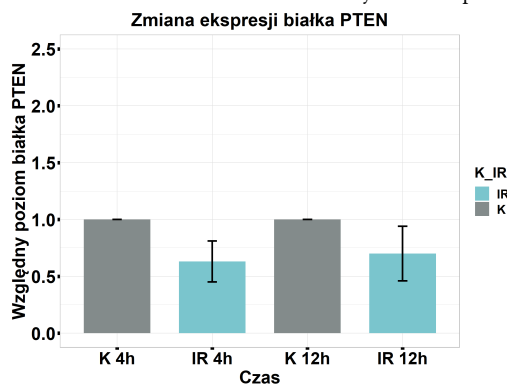


Rysunek 6.5: Porównanie udziałów frakcji dla transkryptu PTEN (a) oraz miR29a (b) w warunkach kontrolnych oraz po napromieniowaniu w dawce 4 Gy.



(a) Całkowity poziom miR29a w komórkach kontrolnych oraz napromieniowanych

(b) Poziom całkowitego transkryptu PTEN w komórkach kontrolnych oraz napromieniowanych



(c) Poziom białka PTEN dla komórek kontrolnych oraz napromieniowanych

Rysunek 6.6: Eksperymentalnie zmierzone całkowite poziomy ekspresji dla miR29a oraz transkryptu i białka PTEN.

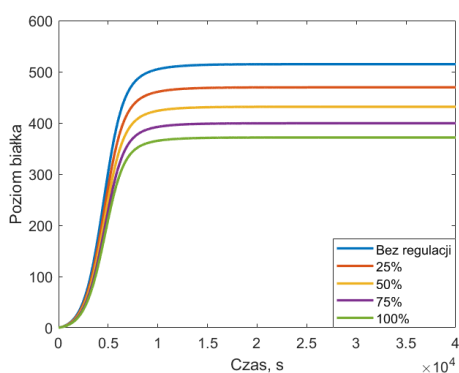
Inaczej jest w przypadku miR29a – jest to mikroRNA dobrze opisane w literaturze pod kątem regulacji PTEN-u [100, 109, 145, 177, 176]. Udziały polisomów w miR29a w warunkach kontrolnych wyraźnie wskazuje na dominację we frakcjach ulegających translacji (z wyraźną przewagą lekkich i ciężkich polisomów), natomiast po promieniowaniu tendencja ta jest odwrotna. Po upływie dwunastu godzin, udziały polisomów dla frakcji duża podjednostka, lekkie oraz ciężkie polisomy są niemal identyczne, a we frakcji wolne mRNA mikroRNA praktycznie nie występuje.

Porównując całkowite poziomy mikroRNA i PTEN, można zauważyć, że gdy po dwunastu godzinach poziom miR29a spada, poziom białka PTEN nieznacznie się podnosi, co może być spowodowane osłabioną regulacją przez mikroRNA (rysunek 6.6).

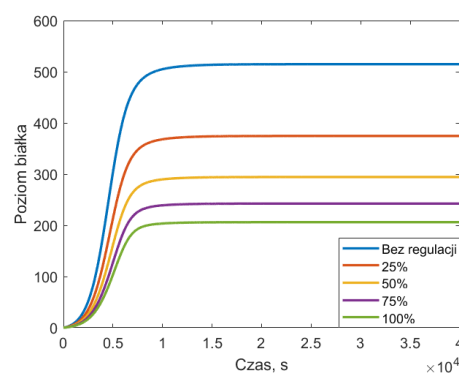
## 6.2 Wyniki symulacji

### 6.2.1 Symulacje dla „czystych” mechanizmów

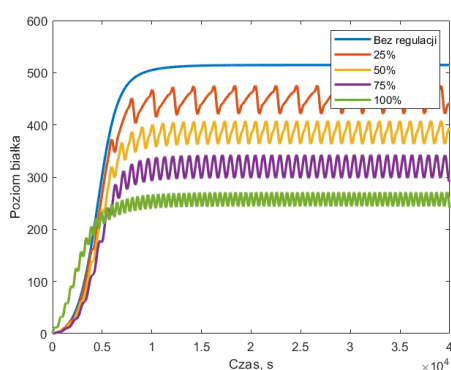
W niniejszym podrozdziale zaprezentowano wyniki hipotetycznych symulacji na podstawie danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu p53 w warunkach kontrolnych. Przedstawione wykresy są przebiegami czasowymi w sytuacji wystąpienia tylko jednego z badanych mechanizmów o takich samych zakresach, jakie wykorzystano w pełnych symulacjach. Przedstawione wykresy wygenerowano osobno dla każdej frakcji z pominięciem frakcji *Wolne mRNA*, w której nie powstaje białko.



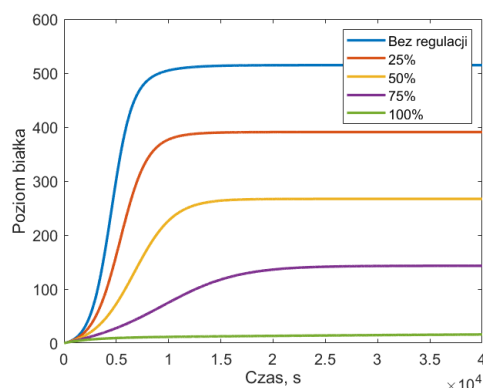
(a) Poziom białka w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M1.



(b) Poziom białka, w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M2.

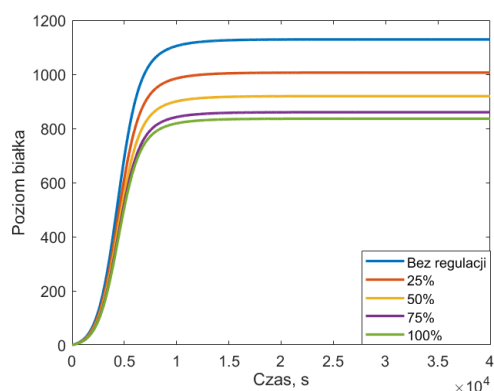


(c) Poziom białka, w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M3.

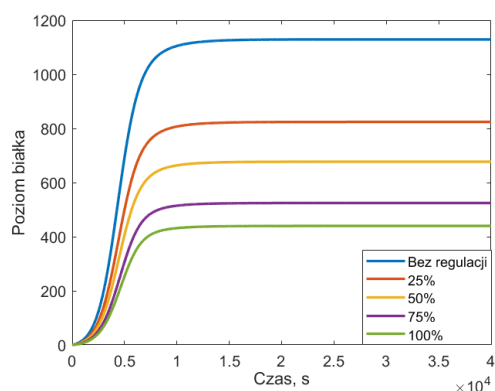


(d) Poziom białka, w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M4.

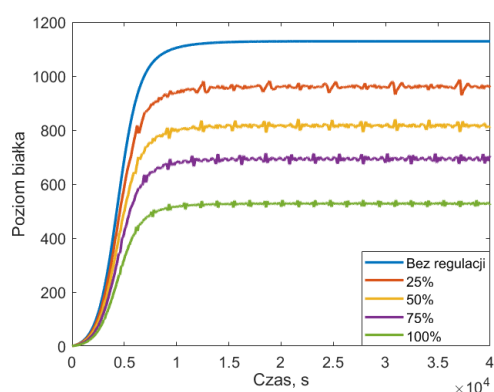
Rysunek 6.7: Poziom białka we frakcji DUŻA PODJEDNOSTKA + MONOSOM, w zależności od siły oddziaływania mechanizmów (M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA).



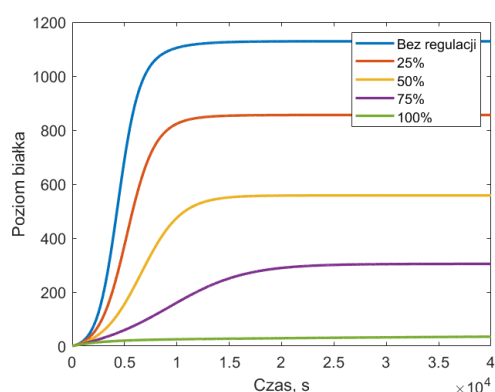
(a) Poziom białka w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M1.



(b) Poziom białka w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M2.

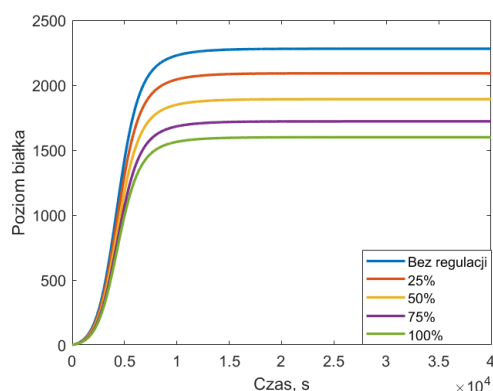


(c) Poziom białka w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M3.

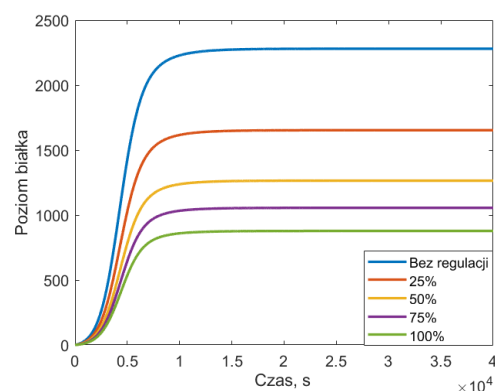


(d) Poziom białka w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M4.

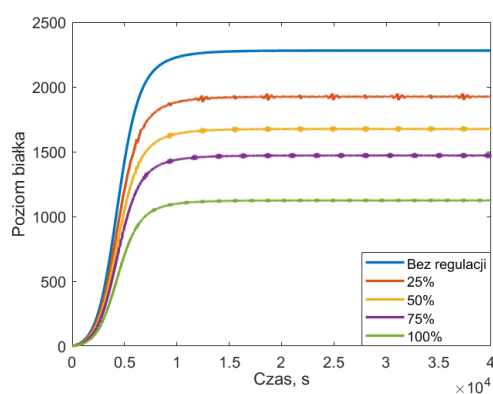
Rysunek 6.8: Poziom białka we frakcji LEKKIE POLISOMY, w zależności od siły oddziaływania mechanizmów (M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA).



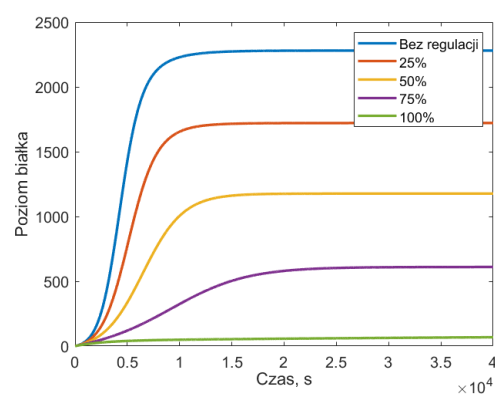
(a) Poziom białka w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M1.



(b) Poziom białka w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M2.

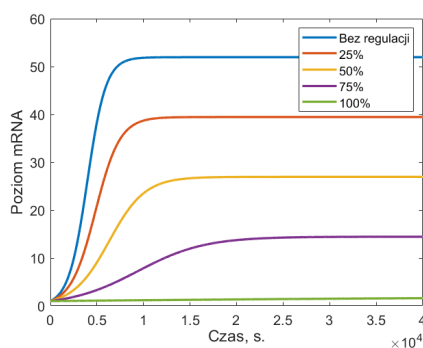


(c) Poziom białka w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M3.



(d) Poziom białka w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M4.

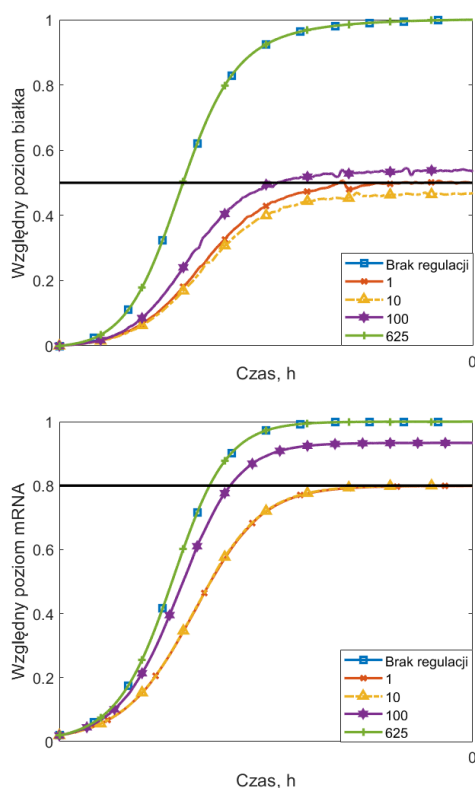
Rysunek 6.9: Poziom białka we frakcji CIĘŻKIE POLISOMY, w zależności od siły oddziaływania mechanizmów (M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA).



Rysunek 6.10: Poziom mRNA w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M4.

### **6.2.2 Wyniki symulacji dla białka i transkryptu p53 z regulacją przez miR-638**

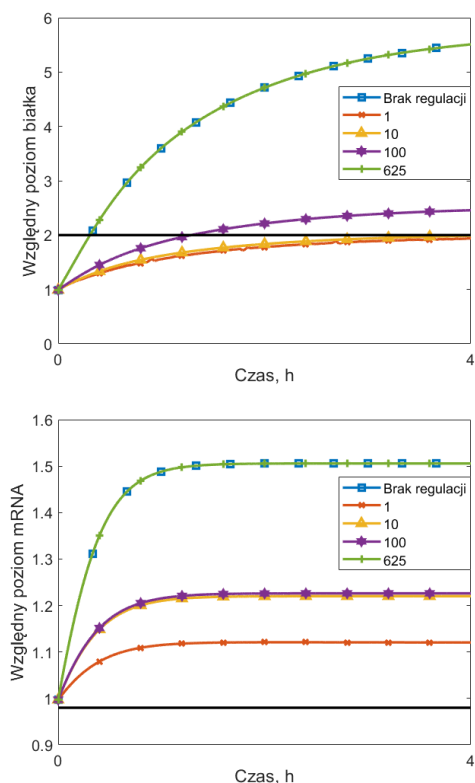
W niniejszym podrozdziale przedstawiono przykładowe wyniki czasowe dla białka i transkryptu p53 wraz z regulacją przez miR-638. Przedstawiono trzy przebiegi czasowe. Dla każdego z przebiegów wygenerowano listę rankingową, która przedstawia kombinację mechanizmu oraz  $\Delta$  obliczaną na podstawie wartości końcowej każdego przebiegu i wartości z wyników z badań eksperymentalnych. Wszystkie przebiegi zostały znormalizowane względem poziomów białek i transkryptów z symulacji bez regulacji przez mikroRNA. Wykresy przedstawiają przebiegi czasowe dla białka i mRNA bez regulacji oraz dla przebiegów będących na liście rankingowej na miejscach 1, 10, 100 i 625 (ostatnim). Przykładowa pełna lista rankingowa została przedstawiona w suplemencie niniejszej rozprawy.



Rysunek 6.11: Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) p53 w warunkach kontrolnych. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 625 miejscu oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych.

Tablica 6.1: Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla kontroli.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA.

Lp.	$\Delta$	M1	M2	M3	M4
1.	0,0016	0,25	0,25	0,25	0,75
2.	0,0024	0,5	0	0,5	0,75
3.	0,0131	0	0	1	0,75
4.	0,0184	0,75	0,25	0	0,75
5.	0,0452	0	0,5	0	0,75
6.	0,0489	1	0	0,25	0,75
7.	0,0497	0,25	0	0,75	0,75
8.	0,0498	0	0,25	0,25	0,75
9.	0,0572	0,75	0	0,25	0,75
10.	0,0622	0	0,25	0,5	0,75
	⋮				
100.	0,2341	0,25	0	1	0,25
	⋮				
625.	1,2500	0	0	0	0

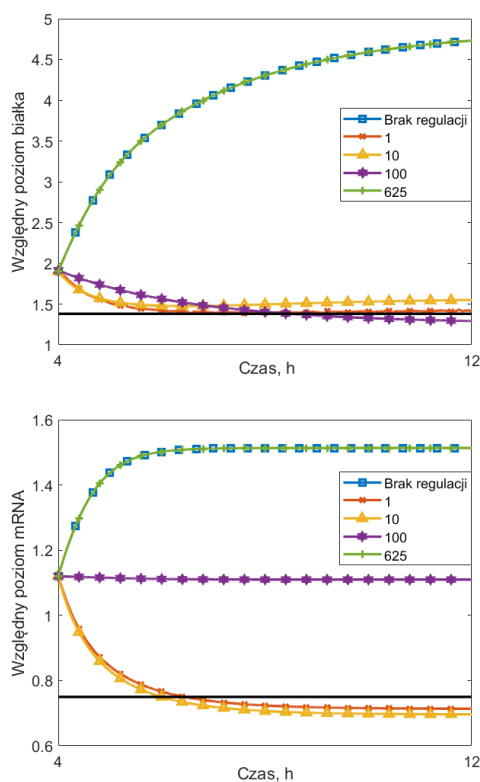


Rysunek 6.12: Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) p53 po upływie czterech godzin od napromieniowania. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 625 miejscu oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych.

Tablica 6.2: Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu p53 – IR 4h.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA.

Lp.	$\Delta$	M1	M2	M3	M4
1.	0,1719	0,5	0	0,5	1
2.	0,1719	0,5	0	0,75	1
3.	0,1719	0,5	0	1	1
4.	0,1934	0,75	0	0,25	1
5.	0,2159	0,5	0,25	0	1
6.	0,2260	0,75	0,25	0	1
7.	0,2369	0,5	0	0,25	1
8.	0,2436	0,5	0,25	0	0,75
9.	0,2442	0	0,25	0,25	1
10.	0,2484	0,75	0,25	0	0,75
	⋮				
100.	0,4769	0,25	0,25	0,25	0,25
	⋮				
625.	2,2869	0	0	0	0





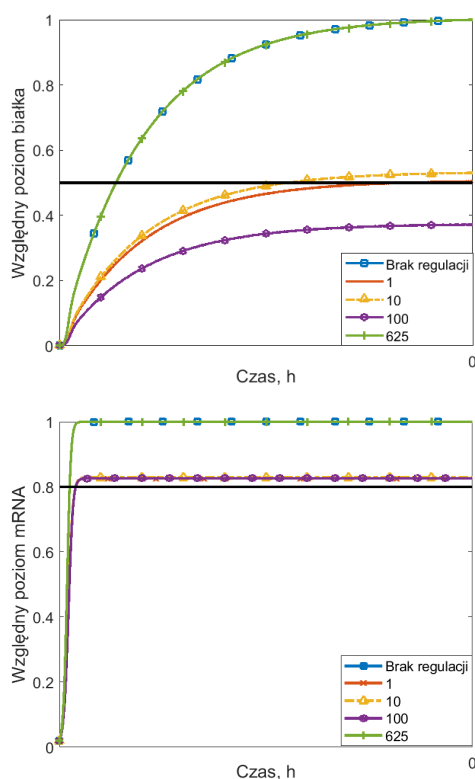
Rysunek 6.13: Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) p53 po upływie dwunastu godzin od napromienienia.

Tablica 6.3: Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu p53 – IR 12h.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA.

Lp.	$\Delta$	M1	M2	M3	M4
<b>1.</b>	0,0764	0	0	0,50	1
<b>2.</b>	0,0764	0	0	1	1
<b>3.</b>	0,0764	0	0	1	1
<b>4.</b>	0,0774	1	0	0	1
<b>5.</b>	0,1011	0	0	0	1
<b>6.</b>	0,1216	0	0	0	1
<b>7.</b>	0,1464	1	0	0	1
<b>8.</b>	0,1642	0,25	0,25	0	1
<b>9.</b>	0,1896	0,50	0	0	1
<b>10.</b>	0,1950	1	0	0	1
	⋮				
<b>100.</b>	0,5438	0,75	0,5	0	0,5
	⋮				
<b>625.</b>	3,4467	0	0	0	0

### **6.2.3 Wyniki symulacji dla białka i transkryptu PTEN z regulacją przez miR-638**

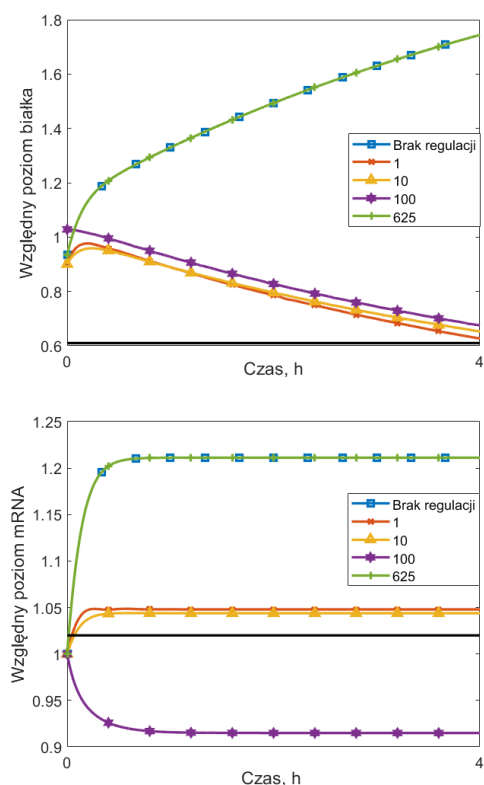
W niniejszym podrozdziale przedstawiono wyniki czasowe dla białka i transkryptu PTEN wraz z regulacją przez miR-638. Przedstawiono trzy przebiegi czasowe. Dla każdego z przebiegów wygenerowano listę rankingową, która przedstawia kombinację mechanizmu oraz wartością  $\Delta$  obliczaną na podstawie wartości końcowej każdego przebiegu i wartości z wyników z badań eksperymentalnych. Wszystkie przebiegi zostały znormalizowane względem poziomów białek i transkryptów z symulacji bez regulacji przez mikroRNA. Wykresy przedstawiają przebiegi czasowe dla białka i mRNA bez regulacji oraz dla przebiegów będących na liście rankingowej na miejscach 1, 10, 100 i 625 (ostatnim).



Rysunek 6.14: Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) PTEN w warunkach kontrolnych. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 i 625 miejscu, oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względną ilość ekspresji otrzymaną z wyników eksperymentalnych.

Tablica 6.4: Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu PTEN dla kontroli.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elon-gacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA.

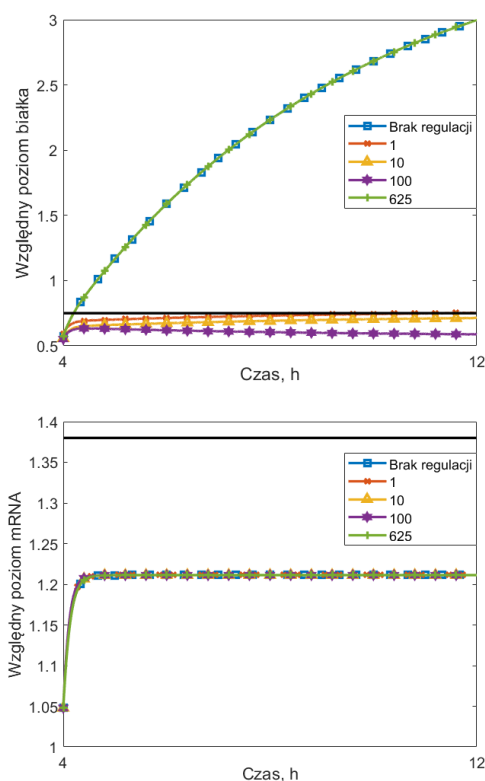
Lp.	$\Delta$	M1	M2	M3	M4
1.	0,0404	0	0,25	0,5	0,75
2.	0,0497	0,5	0	0	1
3.	0,0517	0	0	0,75	1
4.	0,0548	0	0,5	0	1
5.	0,0723	0,25	0,25	0,25	1
6.	0,0753	0	0,5	0,25	0,75
7.	0,0759	0,25	0	0,5	0,75
8.	0,0767	0,25	0	0,25	1
9.	0,0774	0,25	0,25	0,5	0,75
10.	0,0968	0,5	0	0	0,75
	⋮				
100.	0,2885	0,5	0,25	0	0,25
	⋮				
625.	1,2500	0	0	0	0



Rysunek 6.15: Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) PTEN po upływie czterech godzin od napromieniowania. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 i 625 miejscu, oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych.

Tablica 6.5: Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu PTEN – IR4h.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA.

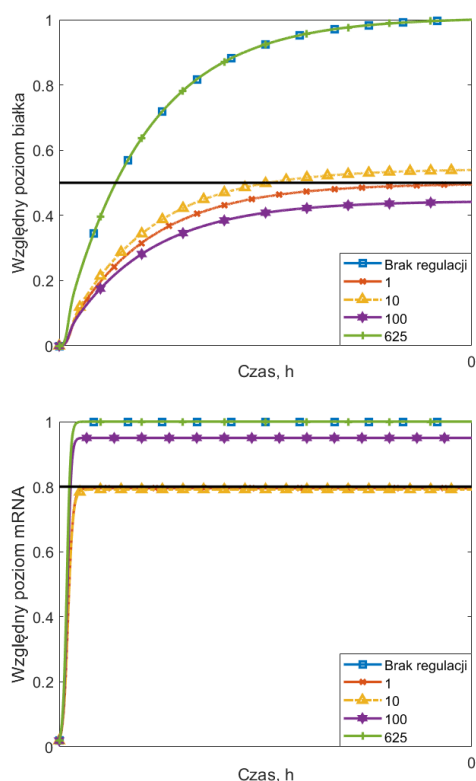
Lp.	$\Delta$	M1	M2	M3	M4
1.	0,0552	1	1	0,25	0,25
2.	0,0620	0,25	1	0,5	0,25
3.	0,0620	0,25	1	0,75	0,25
4.	0,0620	0,25	1	1	0,25
5.	0,0748	1	1	0,5	0,25
6.	0,0748	1	1	0,75	0,25
7.	0,0748	1	1	1	0,25
8.	0,0936	1	0	0,5	0,25
9.	0,0936	1	0	0,75	0,25
10.	0,0936	1	0	1	0,25
100.	0,2104	1	0,25	0,5	0,5
625.	2,0464	0	0	0	0



Rysunek 6.16: Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) PTEN po upływie dwunastu godzin od napromieniowania. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 i 625 miejscu, oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych.

Tablica 6.6: Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu PTEN – IR12h.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA.

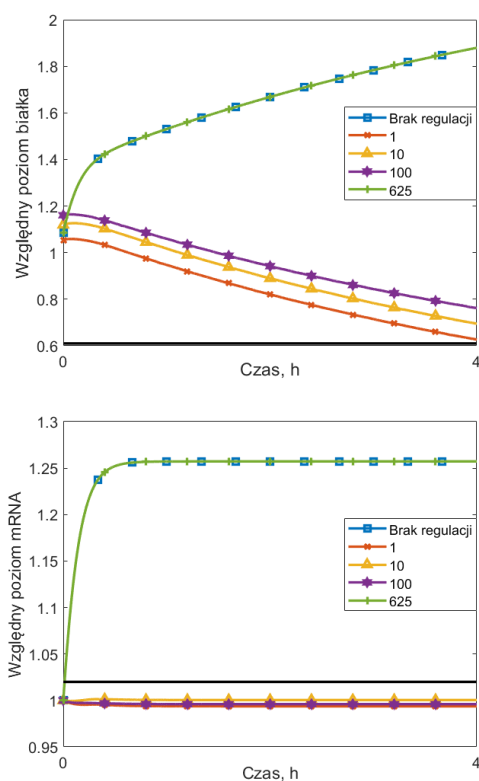
Lp.	$\Delta$	M1	M2	M3	M4
1.	0,1248	0,25	0,75	0,75	0
2.	0,1248	0,25	0,75	1	0
3.	0,1304	1	0,25	0,75	0
4.	0,1304	1	0,25	1	0
5.	0,1409	0	0,75	0,75	0
6.	0,1409	0	0,75	1	0
7.	0,1619	0,75	0,75	0,5	0
8.	0,1648	0,25	1	0,5	0
9.	0,1677	1	0,75	0,5	0
10.	0,1687	0,5	0,5	0,75	0
	⋮				
100.	0,3367	0,5	0,75	0,25	0,25
	⋮				
625.	3,1170	0	0	0	0



Rysunek 6.17: Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) PTEN w warunkach kontrolnych. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 i 625 miejscu, oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych.

Tablica 6.7: Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oddziaływania miR29a oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu PTEN dla kontroli.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA.

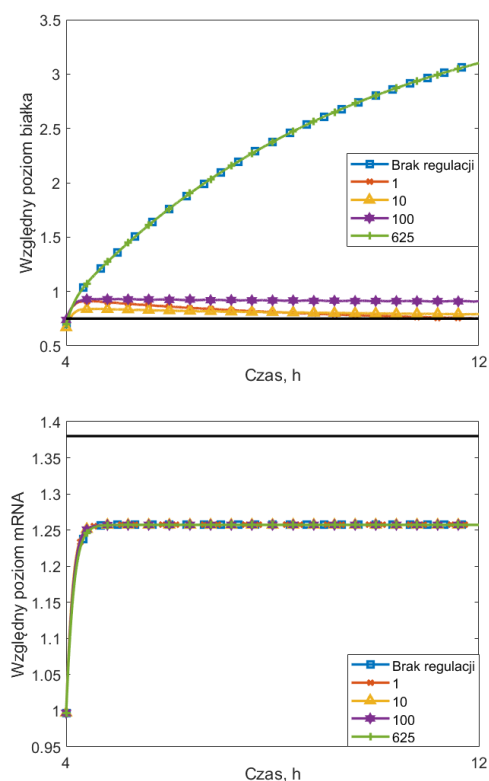
Lp.	$\Delta$	M1	M2	M3	M4
1.	0,0160	0,25	0	0,25	1
2.	0,0563	0	0,25	0,25	1
3.	0,0595	0	0,5	0	1
4.	0,0595	0,25	0,25	0,25	1
5.	0,0706	0,5	0	0	1
6.	0,0736	0	0,25	0,5	0,75
7.	0,0772	0	0	0,75	1
8.	0,0792	0	0	0,75	0,75
9.	0,0811	0,5	0	0	0,75
10.	0,0892	0	0	0,5	1
	⋮				
100.	0,3042	0,5	0,25	0	0
	⋮				
625.	1,2500	0	0	0	0



Rysunek 6.18: Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) PTEN po upływie czterech godzin od napromieniowania. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 i 625 miejscu, oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych.

Tablica 6.8: Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu PTEN – IR 4h.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA.

Lp.	$\Delta$	M1	M2	M3	M4
1.	0,0270	0,75	0,75	0,25	0,5
2.	0,0288	0,5	0,75	0,25	0,5
3.	0,0298	0,25	0,5	0,25	0,5
4.	0,0320	0,25	1	0	0,5
5.	0,0370	1	0,25	0,5	0,5
6.	0,0370	1	0,25	0,75	0,5
7.	0,0370	1	0,25	1	0,5
8.	0,0402	0,75	1	0,25	0,5
9.	0,0438	0,5	1	0,25	0,5
10.	0,0487	0,75	0,25	0,5	0,5
	⋮				
100.	0,1616	1	1	0	0,5
	⋮				
625.	1,9429	0	0	0	0



Rysunek 6.19: Zestawienie wyników symulacji dla transkryptu PTEN po upływie dwunastu godzin od napromieniowania. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 i 625 miejscu, oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych.

Tablica 6.9: Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu PTEN – IR 12h.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA.

Lp.	$\Delta$	M1	M2	M3	M4
1.	0,0921	0,75	0,75	0,75	0
2.	0,0921	0,75	0,75	1	0
3.	0,1036	0	1	0,75	0
4.	0,1036	0	1	1	0
5.	0,1226	1	0,5	0,75	0
6.	0,1226	1	0,5	1	0
7.	0,1325	0,75	0,5	0,75	0
8.	0,1325	0,75	0,5	1	0
9.	0,1414	1	1	0,5	0
10.	0,1436	1	1	0,25	0
	⋮				
100.	0,3027	0,75	0,75	0,5	0
	⋮				
625.	3,2240	0	0	0	0



# Rozdział 7

## Dyskusja wyników

Modelowanie hybrydowe, oparte na maszynach stanowych, prostym automacie oraz równaniach różniczkowych pozwala na kompleksowe podejście do badania regulacji ekspresji genów. W tym celu, dla sprawdzenia poprawności działania modelu, przeprowadzono szereg symulacji dla tzw. „czystych” mechanizmów (wyjaśnienie, czym są czyste mechanizmy zostało opisane w podrozdziale 6.2.1). W zależności od aktywnego mechanizmu, sprawdzono, czy model przedstawia wyniki zgodne z wartościami i założeniami opisanymi w podrozdziale 5.2.3.

Symulacje dla czystych mechanizmów, bardzo przejrzystie przedstawiają, w jaki sposób poziomy białek jak i mRNA są regulowane. Implementacja modelu z wykorzystaniem automatu pozwala również na przybliżenie warunków panujących w komórkach (losowanie liczby rybosomów z rozkładu). Przykładowo, rysunek 6.8a przedstawia działanie mechanizmu M1 we frakcji lekkich polisomów. Mechanizm ten, zależnie od siły oddziaływania, we frakcji monosom, hamuje produkcję białka w sposób proporcjonalny. (rysunek 6.7a). Jednak ze względu na wprowadzenie losowości, rysunek w lekkich polisomach (w których algorytm może wylosować od dwóch do ośmiu rybosomów) nie będzie wykazywać takiej proporcjonalności, jak we frakcji z monosomem, gdzie zawsze występuje tylko jeden rybosom. Dzięki wprowadzeniu losowości algorytm za każdym razem, dla poziomów białek we frakcjach lekkich i ciężkich, będzie generować inne wykresy.

Wprowadzając do modelu dane eksperymentalne, przeprowadzono symulacje mające na celu sprawdzenie, czy którykolwiek z badanych mechanizmów jest mechani-

zmem dominującym, czy też mamy do czynienia z równoległym działaniem więcej niż jednego mechanizmu. Obserwacje oraz wnioski przedstawiono na podstawie tabel rankingowych oraz stopniu dopasowania się modelu do wyników biologicznych, a także informacji zaczerpniętych z literatury.

W przebiegach czasowych modelu translacji dla białka p53 oraz regulacji przez miR638 można zaobserwować silny wpływ mechanizmu degradacji mRNA (M4), który pojawił się w każdym wariantcie symulacji (zarówno w kontroli, jak i po napromieniowaniu) (tabele 6.1 6.2, 6.3. Oznacza to, że miR638 może mieć negatywny wpływ na stabilność mRNA p53, co potwierdza praca [161]. Kolejną ciekawą obserwacją jest brak w pierwszej dziesiątce kombinacji, w której występowałby tylko jeden aktywny mechanizm. Oznacza to, że model nie jest się w stanie dopasować do danych eksperymentalnych, bazując wyłącznie na jednym mechanizmie i potrzebna jest równoległe działanie co najmniej dwóch różnych mechanizmów, co również znajduje swoje potwierdzenie w literaturze [118].

Porównując wyniki symulacji dla kontroli oraz po napromieniowaniu można zaobserwować, że pomiędzy symulacjami z kontroli oraz po napromieniowaniu, żadna kombinacja mechanizmów się nie powtórzyła. W przebiegach dla czterech godzin od napromieniowania, można zauważyć wyraźny spadek siły oddziaływania mechanizmu M2 (wydłużenia elongacji translacji) i jednoczesny wzrost siły oddziaływania mechanizmu M1 (zahamowanie inicjacji translacji). Jest to istotna obserwacja, ponieważ inicjacja jest najlepiej zbadanym mechanizmem regulacji translacji i w wyniku zwiększenia się ekspresji całkowitego miR638 taka obserwacja zwiększa wiarygodność poprawnego działania modelu [25, 60, ?, 95]. Bardzo ciekawym, z punktu widzenia prowadzonych w przyszłości eksperymentów, jest spostrzeżenie, iż mechanizm M3 nie wpływa na poziom białka, co można wyraźnie zaobserwować w tabeli 6.2 na pierwszych trzech pozycjach listy rankingowej; kombinacje mechanizmów różnią się wyłącznie wartością siły oddziaływania mechanizmu M3, a wartość błędu pozostaje bez zmian. Należy mieć na uwadze brak pojawienia się w tych kombinacjach wartości  $M3=0$  oraz  $M3=0.25$ . Może to oznaczać, że mechanizm ten w pewnych warunkach może działać do pewnego poziomu, który już nie powoduje zmian w poziomach ekspresji.

W symulacjach po dwunastu godzinach od napromieniowania, zauważa się wygaszenie działania mechanizmu M2 oraz podobną sytuację do wyników przedstawionych po czterech godzinach, dotyczącą mechanizmu M3 (tabela 6.3). W tym przypadku rów-

niez nie zaobserwowano zmian w ekspresji, mimo zmieniającej się wartości siły oddziaływania. Podobnie jak po czterech godzinach, w każdej kombinacji w pierwszej dziesiątce listy rankingowej pojawia się silnie oddziałujący mechanizm M4.

Gdy przyjrzeć się wartościom błędu dla najlepiej dopasowanego mechanizmu oraz przedstawionym przebiegom, zauważa się, że nie zawsze dopasowanie jest idealne. Może to wynikać z faktu, iż p53 nie jest jedynym genem, w który celuje miR638 (według bazy danych miRDB, która zawiera informacje dotyczące przewidzianych powiązań mikroRNA-target, potencjalnych celów dla tego mikroRNA jest 43, a potencjalnych mikroRNA dla genu TP53 jest aż 102). Niedopasowane wyniki świadczą o tym, że na ekspresją p53 muszą działać inne czynniki, nie uwzględnione w symulacjach, takie jak np. molekuly regulujące poziom p53 (np. Mdm2) [91, 110, 85, 51]. Ponadto, według danych literaturowych, miR638 w komórkach HCT116 charakteryzuje się dosyć niską ekspresją, co również mogło wpłynąć na niedopasowane przebiegi.

W tym celu przeprowadzono dwie kolejne symulacje – dla białka oraz transkryptu PTEN oraz dwóch mikroRNA – jedno (miR638), które jest potencjalnym mikroRNA zaangażowanym w regulację PTENu [161], a także mikroRNA, którego bezpośredni związek z regulacją ekspresji PTEN został dobrze opisany w literaturze (miR29a) [145, 176]. Porównano wyniki symulacji oraz tabele rankingowe z kombinacjami, aby sprawdzić, czy działanie mikroRNA opiera się zwykle na tych samych, bądź podobnych kombinacjach mechanizmów. Porównując do siebie wyniki symulacji dla kontroli (tabele 6.4, 6.7 oraz rysunki 6.14, 6.17), można zauważyć, że większość kombinacji mechanizmów w obu przypadkach pojawiła się w pierwszej dziesiątce; na setnym miejscu jest bardzo podobna kombinacja mechanizmów. Może to oznaczać, że w warunkach fizjologicznych, kiedy komórki nie są narażone na stres, mechanizmy regulacji tego samego transkryptu przez różne mikroRNA są podobne. Podobnie jak w przypadku symulacji P53/miR638, mechanizmem, który pojawił się w każdej kombinacji w pierwszej dziesiątce listy rankingowej jest mechanizm M4 (degradacja mRNA), co więcej, podobnie jak w poprzednich symulacjach, mechanizm ten jest bardzo silny. Pozostałe mechanizmy są na niskich bądź umiarkowanych poziomach siły oddziaływania. Porównując wartości różnicy pomiędzy symulacją, a wynikami eksperymentalnymi, nie zauważa się znaczących różnic pomiędzy symulacjami.

Po narażeniu komórek na stres, mechanizmy regulacji przez mikroRNA przestają być identyczne. Porównując zarówno przebiegi czasowe, jak i tabele rankingowe, zauważa

się, że tym razem ani jeden mechanizm się nie pokrył pomiędzy symulacjami (tabele 6.5, 6.8, rysunki 6.15, 6.18). Symulacja PTEN/miR638, po czterech godzinach od napromieniowania, wyraźnie przesuwa siłę oddziaływania mechanizmów w stronę mechanizmu M1 i M2 (M1 - zahamowanie inicjacji, M2 – wydłużenie elongacji), przy jednoczesnym osłabieniu mechanizmu M4. W symulacji PTEN/miR29a. Co prawda doszło również do aktywacji mechanizmów M1 i M2, jednak na znacznie słabszym poziomie, niż w symulacji PTEN/miR638. Mechanizm M4 w symulacji PTEN/miR29a również został osłabiony, ale w mniejszym stopniu niż w symulacji PTEN/miR638. W obu symulacjach można zobaczyć podobną zależność odnośnie mechanizmu M3 (przedwczesne odłączenie się rybosomu), jak w przypadku regulacji p53/miR638. W tym przypadku również, od pewnej wartości siły oddziaływania, obserwuje się brak wpływu działania mechanizmu M3 na poziom białka. Na tej podstawie można wnioskować, że mechanizm M3 jest albo słabo działającym mechanizmem, albo odłączanie się rybosomów nie wynika bezpośrednio z interakcji mikroRNA-mRNA. Bardzo prawdopodobnym wytłumaczeniem na takie zjawisko jest fakt, iż mRNA połączone z polisomami wykazuje większą stabilność [111]. Dzieje się tak, ponieważ transkrypty gęsto obłożone rybosomami utrudniają dostęp do końców UTR, ograniczając tym samym możliwość przyłączenia się mikroRNA. Porównując wartości różnicy pomiędzy symulacją a wynikami eksperymentalnymi, wyraźnie zauważa się lepsze dopasowanie w przypadku miR29a – różnica pomiędzy wartościami jest dwukrotna.

Po upływie dwunastu godzin dalej nie obserwujemy wspólnych mechanizmów pomiędzy symulacjami, natomiast wspólną cechą obydwu symulacji jest całkowite wyłączenie się regulacji z udziałem mechanizmu M4 (rysunki 6.19, 6.16, tabele 6.9,6.9).

W celu sprawdzenia, czy są jakiegokolwiek powiązania w regulacji pomiędzy różnymi transkryptami, porównano tabele rankingowe dla p53 oraz PTENu. W symulacjach dla kontroli tylko jedna kombinacja mechanizmów się powieliła, natomiast po promieniowaniu nie znaleziono żadnej wspólnej kombinacji. Może to oznaczać, że dla każdego transkryptu, mikroRNA działa inaczej.

# Rozdział 8

## Podsumowanie

W ramach niniejszej Rozprawy zrealizowano główny cel - zbudowany został model translacji pojedynczego transkryptu, umożliwiający analizę wpływu wybranych mechanizmów regulacyjnych na wydajność translacji. Model został sparametryzowany na podstawie autorskich wyników eksperymentalnych oraz danych pozyskanych z dostępnej literatury.

Wyniki uzyskane przez Autorkę rozprawy w badaniach eksperymentalnych stanowiły zarówno dane wejściowe przy budowie modelu translacji (profile polisomalne, poziom ekspresji mikroRNA), jak i były wykorzystane do weryfikacji działania modelu translacji (poziomy ekspresji pojedynczego mRNA i białek).

W przedstawionej rozprawie Autorka przedstawiła model translacji z wykorzystaniem maszyn stanowych. Model ten wykorzystywał rozkład rybosomów w obrębie pojedynczego transkryptu oraz całkowite poziomy ekspresji białek, mRNA oraz regulujących ich mikroRNA.

Zgodnie z wiedzą Autorki, zaproponowana przez Autorkę metoda modelowania nie była nigdy wcześniej wykorzystana w modelowaniu procesu translacji. Przedstawiony w Rozprawie model charakteryzuje się względnie prostą implementacją, a także wierniejszym odtworzeniem badanego układu biologicznego w porównaniu do innych metod modelowania (jak np. wprowadzenie do układu rozkładu polisomalnego). Istotną zaletą modelu jest możliwość określania wpływu poszczególnych mechanizmów regulacji przez mikroRNA na poziom ekspresji białek.

Porównując wyniki eksperymentalne z wynikami symulacji, można stwierdzić, że

model dobrze odzwierciedla regulację procesu translacji zależną od mikroRNA i promieniowania jonizującego. Zaproponowany model ma na celu pomóc biologom w planowaniu eksperymentów. Wyniki pozyskane z symulacji mogą stanowić podstawę oraz punkt odniesienia podczas przeprowadzania badań rozwijających poruszone w Rozprawie zagadnienie. Potwierdza to więc postawioną w Rozprawie tezę, że modele hybrydowe wykorzystujące maszyny stanowe są skutecznym narzędziem pozwalającym na postawienie i wstępną weryfikację hipotez, dotyczących biochemicznych mechanizmów regulacyjnych.

Zarówno wyniki przebiegów czasowych jak i tabele rankingowe wyraźnie wskazują na kompleksowość mechanizmów regulacji – żaden z najlepiej dopasowanych przebiegów według listy rankingowej nie charakteryzował się działaniem wyłącznie jednego mechanizmu. Na tej podstawie oraz na podstawie doniesień literaturowych można potwierdzić drugą tezę, że regulacja ekspresji białek, zależna od mikroRNA wykorzystuje równolegle wiele mechanizmów.

Na podstawie otrzymanych wyników symulacji, można stwierdzić, że w wyniku narażenia komórek na stres, mechanizmy regulacji z udziałem mikroRNA działają inaczej dla każdego transkryptu. Potwierdza to trzecią tezę postawioną w Rozprawie – Mechanizm regulacji translacji z udziałem mikroRNA zależy od konkretnego mRNA i mikroRNA.



# Bibliografia

- [1] Bruce Alberts. *Molecular biology of the cell*. Garland science, 2017.
- [2] Lourdes M Alemán, John Doench, Phillip A Sharp. Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *Rna*, 13(3):385–395, 2007.
- [3] Tomas Aparicio, Richard Baer, Jean Gautier. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA repair*, 19:169–175, 2014.
- [4] Yoav Arava, Yulei Wang, John D Storey, Chih Long Liu, Patrick O Brown, Daniel Herschlag. Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7):3889–3894, 2003.
- [5] Irem Avcilar-Kucukgoze, Anna Kashina. Hijacking tRNAs from translation: regulatory functions of tRNAs in mammalian cell physiology. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7:610617, 2020.
- [6] Shveta Bagga, John Bracht, Shaun Hunter, Katlin Massirer, Janette Holtz, Rachel Eachus, Amy E Pasquinelli. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, 122(4):553–563, 2005.
- [7] Rajamanickam Baskar, Jiawen Dai, Nei Wenlong, Richard Yeo, Kheng-Wei Yeoh. Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in molecular biosciences*, 1:24, 2014.
- [8] Grzegorz Bazydło, Marian Adamski. Obsługa wyjątków w maszynie stanowej UML realizowanej w mikrosystemach cyfrowych. *Pomiary Automatyka Kontrola*, 56(7):728–731, 2010.



- [9] David L Bentley. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nature Reviews Genetics*, 15(3):163–175, 2014.
- [10] Juan A Bernal, Agustín Hernández. p53 stabilization can be uncoupled from its role in transcriptional activation by loss of PTTG1/securin. *The journal of biochemistry*, 141(5):737–745, 2007.
- [11] Mamatha Bhat, Nathaniel Robichaud, Laura Hulea, Nahum Sonenberg, Jerry Pelletier, Ivan Topisirovic. Targeting the translation machinery in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 14(4):261–278, 2015.
- [12] Animesh Bhattacharya, Ulf Schmitz, Yvonne Raatz, Madeleine Schönherr, Tina Kottek, Marianne Schauer, Sandra Franz, Anja Saalbach, Ulf Andereg, Olaf Wolkenhauer, i in. miR-638 promotes melanoma metastasis and protects melanoma cells from apoptosis and autophagy. *Oncotarget*, 6(5):2966, 2015.
- [13] Pierre Bonnin, Norbert Kern, Neil T Young, Ian Stansfield, M Carmen Romano. Novel mRNA-specific effects of ribosome drop-off on translation rate and poly-some profile. *PLoS computational biology*, 13(5):e1005555, 2017.
- [14] Chris A Brackley, David S Broomhead, M Carmen Romano, Marco Thiel. A max-plus model of ribosome dynamics during mRNA translation. *Journal of Theoretical Biology*, 303:128–140, 2012.
- [15] Gloria A Brar, Jonathan S Weissman. Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 16(11):651–664, 2015.
- [16] James P Broughton, Michael T Lovci, Jessica L Huang, Gene W Yeo, Amy E Pasquini. Pairing beyond the seed supports microRNA targeting specificity. *Molecular cell*, 64(2):320–333, 2016.
- [17] Frank Buttgereit, Martin D Brand. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochemical Journal*, 312(1):163–167, 1995.
- [18] Sebastian M Castillo-Hair, Georg Seelig. Machine learning for designing next-generation mRNA therapeutics. *Accounts of Chemical Research*, 55(1):24–34, 2021.

- 
- [19] Caterina Catalanotto, Carlo Cogoni, Giuseppe Zardo. MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *International journal of molecular sciences*, 17(10):1712, 2016.
- [20] Federica Cella, Giansimone Perrino, Fabiana Tedeschi, Gabriella Viero, Carla Borgia, Guy-Bart Stan, Velia Siciliano. MIRELLA: a mathematical model explains the effect of microRNA-mediated synthetic genes regulation on intracellular resource allocation. *Nucleic Acids Research*, strona gkad151, 2023.
- [21] Yonglin Chen, Jian Cui, Yaqi Gong, Shuang Wei, Yuanyun Wei, Lan Yi. MicroRNA: A novel implication for damage and protection against ionizing radiation. *Environmental Science and Pollution Research*, 28:15584–15596, 2021.
- [22] Jennifer Chu, Jerry Pelletier. Therapeutic opportunities in eukaryotic translation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(6):a032995, 2018.
- [23] Luca Ciandrini, Ian Stansfield, M Carmen Romano. Ribosome traffic on mRNAs maps to gene ontology: genome-wide quantification of translation initiation rates and polysome size regulation. *PLoS computational biology*, 9(1):e1002866, 2013.
- [24] Andreas Czech, Sandra Wende, Mario Mörl, Tao Pan, Zoya Ignatova. Reversible and rapid transfer-RNA deactivation as a mechanism of translational repression in stress. *PLoS genetics*, 9(8):e1003767, 2013.
- [25] Tamas Dalmay. Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. *Essays in biochemistry*, 54:29–38, 2013.
- [26] Dorothee Deckbar, Penny A Jeggo, Markus Löbrich. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 46(4):271–283, 2011.
- [27] Gabrielle Deschamps-Francoeur, Daniel Garneau, Fabien Dupuis-Sandoval, Audrey Roy, Marie Frappier, Mathieu Catala, Sonia Couture, Mélissa Barbe-Marcoux, Sherif Abou-Elela, Michelle S Scott. Identification of discrete classes of small nucleolar RNA featuring different ends and RNA binding protein dependency. *Nucleic Acids Research*, 42(15):10073–10085, 2014.

- [28] Thomas E Dever, Jonathan D Dinman, Rachel Green. Translation elongation and recoding in eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(8):a032649, 2018.
- [29] Alon Diamant, Anna Feldman, Elisheva Schochet, Martin Kupiec, Yoav Arava, Tamar Tuller. The extent of ribosome queuing in budding yeast. *PLoS computational biology*, 14(1):e1005951, 2018.
- [30] Hao Dong, Mukesh Sharma, Huan-Xiang Zhou, Timothy A Cross. Glycines: role in  $\alpha$ -helical membrane protein structures and a potential indicator of native conformation. *Biochemistry*, 51(24):4779–4789, 2012.
- [31] Eric Charles Dykeman. A stochastic model for simulating ribosome kinetics in vivo. *PLoS computational biology*, 16(2):e1007618, 2020.
- [32] Edward Emmott, Marko Jovanovic, Nikolai Slavov. Ribosome stoichiometry: from form to function. *Trends in biochemical sciences*, 44(2):95–109, 2019.
- [33] Maria Escriva, Sandra Peiró, Nicolás Herranz, Patricia Villagrasa, Natalia Dave, Bárbara Montserrat-Sentís, Stephen A Murray, Clara Francí, Thomas Gridley, Ismo Virtanen, i in. Repression of PTEN phosphatase by Snail1 transcriptional factor during gamma radiation-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 28(5):1528–1540, 2008.
- [34] Ana Eulalio, Isabelle Behm-Ansmant, Daniel Schweizer, Elisa Izaurralde. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Molecular and cellular biology*, 27(11):3970–3981, 2007.
- [35] Witold Filipowicz, Suvendra N Bhattacharyya, Nahum Sonenberg. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews genetics*, 9(2):102–114, 2008.
- [36] Aaron Fluitt, Elsje Pienaar, Hendrik Viljoen. Ribosome kinetics and aa-tRNA competition determine rate and fidelity of peptide synthesis. *Computational biology and chemistry*, 31(5-6):335–346, 2007.

- 
- [37] Joshua J Forman, Aster Legesse-Miller, Hilary A Collier. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39):14879–14884, 2008.
- [38] Alexander Franks, Edoardo Airoidi, Nikolai Slavov. Post-transcriptional regulation across human tissues. *PLoS computational biology*, 13(5):e1005535, 2017.
- [39] Ludmila Yu Frolova, Ruslan Yu Tsivkovskii, Galina F Sivolobova, Nina Yu Oparina, Oleg I Serpinsky, Vladimir M Blinov, Sergey I Tatkov, Lev L Kisselev. Mutations in the highly conserved ggq motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human erf1 to trigger peptidyl-trna hydrolysis. *Rna*, 5(8):1014–1020, 1999.
- [40] Loning Fu, Samuel Benchimol. Participation of the human p53 3 UTR in translational repression and activation following  $\gamma$ -irradiation. *The EMBO journal*, 16(13):4117–4125, 1997.
- [41] Paolo Gandellini, Tiziana Rancati, Riccardo Valdagni, Nadia Zaffaroni. miRNAs in tumor radiation response: bystanders or participants? *Trends in molecular medicine*, 20(9):529–539, 2014.
- [42] Sarah Geisler, Jeff Collier. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(11):699–712, 2013.
- [43] Maxim V Gerashchenko, Alexei V Lobanov, Vadim N Gladyshev. Genome-wide ribosome profiling reveals complex translational regulation in response to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(43):17394–17399, 2012.
- [44] Arnab Ghosh, Anton A Komar. Eukaryote-specific extensions in ribosomal proteins of the small subunit: Structure and function. *Translation*, 3(1):e999576, 2015.
- [45] José Santiago González García, Joaquín Delgado. Stochastic microswimming model of ribosome motion on the polysome. *The European Physical Journal E*, 44:1–11, 2021.

- [46] Thomas E Goroichowski, Zoya Ignatova, Roel AL Bovenberg, Johannes A Roubos. Trade-offs between tRNA abundance and mRNA secondary structure support smoothing of translation elongation rate. *Nucleic acids research*, 43(6):3022–3032, 2015.
- [47] Bo-Jhih Guan, Vincent van Hoef, Raul Jobava, Orna Elroy-Stein, Leos S Valasek, Marie Cargnello, Xing-Huang Gao, Dawid Krokowski, William C Merrick, Scot R Kimball, i in. A unique ISR program determines cellular responses to chronic stress. *Molecular cell*, 68(5):885–900, 2017.
- [48] Gong-she Guo, Feng-mei Zhang, Rui-jie Gao, Robert Delsite, Zhi-hui Feng, Simon N Powell. DNA repair and synthetic lethality. *International journal of oral science*, 3(4):176–179, 2011.
- [49] Huili Guo, Nicholas T Ingolia, Jonathan S Weissman, David P Bartel. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308):835–840, 2010.
- [50] Minju Ha, V Narry Kim. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(8):509–524, 2014.
- [51] Lucia Haronikova, Vanesa Olivares-Illana, Lixiao Wang, Konstantinos Karakostis, Sa Chen, Robin Fåhræus. The p53 mRNA: an integral part of the cellular stress response. *Nucleic acids research*, 47(7):3257–3271, 2019.
- [52] Mingyang He, Yi Lin, Yunlan Tang, Yi Liu, Weiwei Zhou, Chuang Li, Guihong Sun, Mingxiong Guo. miR-638 suppresses DNA damage repair by targeting SMC1A expression in terminally differentiated cells. *Aging (Albany NY)*, 8(7):1442, 2016.
- [53] Myriam Heiman, Ruth Kulicke, Robert J Fenster, Paul Greengard, Nathaniel Heintz. Cell type-specific mRNA purification by translating ribosome affinity purification (TRAP). *Nature protocols*, 9(6):1282–1291, 2014.
- [54] Christopher UT Hellen. Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(10):a032656, 2018.

- 
- [55] David G Hendrickson, Daniel J Hogan, Heather L McCullough, Jason W Myers, Daniel Herschlag, James E Ferrell, Patrick O Brown. Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS biology*, 7(11):e1000238, 2009.
- [56] Matthias W Hentze, Alfredo Castello, Thomas Schwarzl, Thomas Preiss. A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(5):327–341, 2018.
- [57] John WB Hershey, Nahum Sonenberg, Michael B Mathews. Principles of translational control. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11(9):a032607, 2019.
- [58] Valerie Heurgue-Hamard, Reza Karimi, Liliana Mora, Jane MacDougall, Celine Leboeuf, Guido Grentzmann, Måns Ehrenberg, Richard H Buckingham. Ribosome release factor RF4 and termination factor RF3 are involved in dissociation of peptidyl-tRNA from the ribosome. *The EMBO Journal*, 17(3):808–816, 1998.
- [59] Jason Ho, Edward S Cruise, Ryan JO Dowling, Vuk Stambolic. PTEN nuclear functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(5), 2020.
- [60] David T Humphreys, Belinda J Westman, David IK Martin, Thomas Preiss. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly (A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47):16961–16966, 2005.
- [61] Eric Huntzinger, Elisa Izaurralde. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews Genetics*, 12(2):99–110, 2011.
- [62] Mahboob Ul Hussain. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell and tissue research*, 349(2):405–413, 2012.
- [63] Nicholas T Ingolia, Sina Ghaemmaghami, h John RS Newman, Jonathan S Weissman. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *science*, 324(5924):218–223, 2009.

- [64] Jonathan J Ipsaro, Leemor Joshua-Tor. From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nature structural & molecular biology*, 22(1):20–28, 2015.
- [65] Pavel Ivanov, Mohamed M Emara, Judit Villen, Steven P Gygi, Paul Anderson. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Molecular cell*, 43(4):613–623, 2011.
- [66] Richard J Jackson, Christopher UT Hellen, Tatyana V Pestova. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(2):113–127, 2010.
- [67] Richard J Jackson, Christopher UT Hellen, Tatyana V Pestova. Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 86:45–93, 2012.
- [68] François Jacob, Jacques Monod. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*, 3(3):318–356, 1961.
- [69] Naduparambil Korah Jacob, James V Cooley, Tamara N Yee, Jidhin Jacob, Hansjuerg Alder, Priyankara Wickramasinghe, Kirsteen H Maclean, Arnab Chakravarti. Identification of sensitive serum microRNA biomarkers for radiation biodosimetry. *PloS one*, 8(2):e57603, 2013.
- [70] Sunil Jain. Radiation in medical practice & health effects of radiation: Rationale, risks, and rewards. *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 10(4):1520, 2021.
- [71] Kurt Jensen. Coloured Petri nets and the invariant-method. *Theoretical computer science*, 14(3):317–336, 1981.
- [72] Meng Jia, Zhidong Wang. MicroRNAs as biomarkers for ionizing radiation injury. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 2022.
- [73] Jun Katahira. Nuclear export of messenger RNA. *Genes*, 6(2):163–184, 2015.
- [74] Tomoko Kawamata, Yukihide Tomari. Making risc. *Trends in biochemical sciences*, 35(7):368–376, 2010.

- 
- [75] Amit Kessel, Nir Ben-Tal. *Introduction to proteins: structure, function, and motion*. Crc Press, 2018.
- [76] Basel Khraiwesh, M Asif Arif, Gotelinde I Seumel, Stephan Ossowski, Detlef Weigel, Ralf Reski, Wolfgang Frank. Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell*, 140(1):111–122, 2010.
- [77] Christina Kiel, Eva Yus, Luis Serrano. Engineering signal transduction pathways. *Cell*, 140(1):33–47, 2010.
- [78] Daniel H Kim, Pål Sætrom, Ola Snøve Jr, John J Rossi. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(42):16230–16235, 2008.
- [79] HA King, AP Gerber. Translatome profiling: methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Brief Funct Genomics* 15, 22–31, 2016.
- [80] Edda Klipp, Wolfram Liebermeister. Mathematical modeling of intracellular signaling pathways. *BMC neuroscience*, 7:1–16, 2006.
- [81] Linda Koch. Adding another dimension to gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 16(10):563–563, 2015.
- [82] Guangyao Kong, Junping Zhang, Shuai Zhang, Changliang Shan, Lihong Ye, Xiaodong Zhang. Upregulated microRNA-29a by hepatitis B virus X protein enhances hepatoma cell migration by targeting PTEN in cell culture model. *PloS one*, 6(5):e19518, 2011.
- [83] Andrei A Korostelev. Structural aspects of translation termination on the ribosome. *Rna*, 17(8):1409–1421, 2011.
- [84] Monty Krieger, Matthew P Scott, PT Matsudaira, HF Lodish, James E Darnell, Lawrence Zipursky, Chris Kaiser, Arnold Berk. *Molecular cell biology*. San Francisco, 2004.
- [85] Michael HG Kubbutat, Stephen N Jones, Karen H Vousden. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, 387(6630):299–303, 1997.



- [86] Satomi Kuramochi-Miyagawa, Toshiaki Watanabe, Kengo Gotoh, Kana Takamatsu, Shinichiro Chuma, Kanako Kojima-Kita, Yusuke Shiromoto, Noriko Asada, Atsushi Toyoda, Asao Fujiyama, i in. MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes & development*, 24(9):887–892, 2010.
- [87] Eric P Kusnadi, Anna S Trigos, Carleen Cullinane, David L Goode, Ola Larsson, Jennifer R Devlin, Keefe T Chan, David P De Souza, Malcolm J McConville, Grant A McArthur, i in. Reprogrammed mRNA translation drives resistance to therapeutic targeting of ribosome biogenesis. *The EMBO Journal*, 39(21):e105111, 2020.
- [88] Charles Land. Ionizing radiation. *Encyclopedia Britannica*, 2023.
- [89] Chang-Lung Lee, Jordan M Blum, David G Kirsch. Role of p53 in regulating tissue response to radiation by mechanisms independent of apoptosis. *Translational cancer research*, 2(5):412, 2013.
- [90] Kathrin Leppeck, Rhiju Das, Maria Barna. Functional 5' UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(3):158–174, 2018.
- [91] Yaara Levav-Cohen, Zehavit Goldberg, Kah Hin Tan, Osnat Alsheich-Bartok, Valentina Zuckerman, Sue Haupt, Ygal Haupt. The p53-Mdm2 loop: a critical juncture of stress response. *Mutant p53 and MDM2 in Cancer*, strony 161–186, 2014.
- [92] Jingyi Jessica Li, Peter J Bickel, Mark D Biggin. System wide analyses have underestimated protein abundances and the importance of transcription in mammals. *PeerJ*, 2:e270, 2014.
- [93] Jingyi Jessica Li, Mark D Biggin. Gene expression. Statistics requantitates the central dogma. *Science (New York, NY)*, 347(6226):1066–1067, 2015.
- [94] Jiqiang Ling, Dieter Söll. Severe oxidative stress induces protein mistranslation through impairment of an aminoacyl-tRNA synthetase editing site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9):4028–4033, 2010.

- 
- [95] Jidong Liu. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Current opinion in cell biology*, 20(2):214–221, 2008.
- [96] Kenneth J Livak, Thomas D Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-  $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4):402–408, 2001.
- [97] Cesar Llave, Zhixin Xie, Kristin D Kasschau, James C Carrington. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science*, 297(5589):2053–2056, 2002.
- [98] Patricia A Maroney, Yang Yu, Jesse Fisher, Timothy W Nilsen. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature structural & molecular biology*, 13(12):1102–1107, 2006.
- [99] Kiyoshi Masuda, Kotb Abdelmohsen, Mihee M Kim, Subramanya Srikantan, Eun Kyung Lee, Kumiko Tominaga, Roza Selimyan, Jennifer L Martindale, Xiaoling Yang, Elin Lehrmann, i in. Global dissociation of HuR–mRNA complexes promotes cell survival after ionizing radiation. *The EMBO journal*, 30(6):1040–1053, 2011.
- [100] Nicola McCarthy. YAP, PTEN and miR-29 size each other up. *Nature Reviews Cancer*, 13(1):4–5, 2013.
- [101] Ali Mehdipour, Aliakbar Yousefi-Ahmadipour, Derek Kennedy, Mohammad Kazemi Arababadi. Ionizing radiation and toll like receptors: a systematic review article. *Human Immunology*, 82(6):446–454, 2021.
- [102] Joshua T Mendell. MicroRNAs: critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell cycle*, 4(9):1179–1184, 2005.
- [103] Tim R Mercer, Marcel E Dinger, John S Mattick. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature reviews genetics*, 10(3):155–159, 2009.
- [104] William C Merrick, Graham D Pavitt. Protein synthesis initiation in eukaryotic cells. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(12):a033092, 2018.

- [105] Flavio Mignone, Carmela Gissi, Sabino Liuni, Graziano Pesole. Untranslated regions of mRNAs. *Genome biology*, 3:1–10, 2002.
- [106] Rita Mihailescu. Gene expression regulation: lessons from noncoding RNAs. *RNA*, 21(4):695–696, 2015.
- [107] Mei Ming, Yu-Ying He. PTEN in DNA damage repair. *Cancer letters*, 319(2):125–129, 2012.
- [108] E Mladenov, S Magin, A Soni, G Iliakis. DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Front Oncol.* 2013; 3: 113. *Interesting overview of the importance of DNA double-strand break repair in radiosensitivity*, 2013.
- [109] Wen-Yan Mo, Shi-Qiong Cao. MiR-29a-3p: A potential biomarker and therapeutic target in colorectal cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 25(3):563–577, 2023.
- [110] Ute M Moll, Oleksi Petrenko. The MDM2-p53 interaction. *Molecular cancer research*, 1(14):1001–1008, 2003.
- [111] Natali Molotski, Yoav Soen. Differential association of microRNAs with polyosomes reflects distinct strengths of interactions with their mRNA targets. *Rna*, 18(9):1612–1623, 2012.
- [112] Stephen B Montgomery, Emmanouil T Dermitzakis. From expression QTLs to personalized transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 12(4):277–282, 2011.
- [113] Masahiro Morita, Simon-Pierre Gravel, Valerie Chenard, Kristina Sikström, Liang Zheng, Tommy Alain, Valentina Gandin, Daina Avizonis, Meztli Arguello, Chadi Zakaria, i in. mTORC1 controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. *Cell metabolism*, 18(5):698–711, 2013.
- [114] Nadya Morozova, Andrei Zinovyev, Nora Nonne, Linda-Louise Pritchard, Alexander N Gorban, Annick Harel-Bellan. Kinetic signatures of microRNA modes of action. *Rna*, 18(9):1635–1655, 2012.

- 
- [115] Muhammad Ali S Mumtaz, Juan Pablo Couso. Ribosomal profiling adds new coding sequences to the proteome. *Biochemical Society Transactions*, 43(6):1271–1276, 2015.
- [116] Dokyun Na, Sunjae Lee, Doheon Lee. Mathematical modeling of translation initiation for the estimation of its efficiency to computationally design mRNA sequences with desired expression levels in prokaryotes. *BMC systems biology*, 4:1–16, 2010.
- [117] Nagammal Neelagandan, Irene Lamberti, Hugo JF Carvalho, Cédric Gobet, Felix Naef. What determines eukaryotic translation elongation: recent molecular and quantitative analyses of protein synthesis. *Open biology*, 10(12):200292, 2020.
- [118] Timothy W Nilsen. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *TRENDS in Genetics*, 23(5):243–249, 2007.
- [119] Hans Noll. The discovery of polyribosomes. *BioEssays*, 30(11-12):1220–1234, 2008.
- [120] Stephanie Nottrott, Martin J Simard, Joel D Richter. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature structural & molecular biology*, 13(12):1108–1114, 2006.
- [121] Jacob O’Brien, Heyam Hayder, Yara Zayed, Chun Peng. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9:402, 2018.
- [122] Ryuji Okazaki. Role of p53 in regulating radiation responses. *Life*, 12(7):1099, 2022.
- [123] Ulf Andersson Ørom, Finn Cilius Nielsen, Anders H Lund. MicroRNA-10a binds the 5’ UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular cell*, 30(4):460–471, 2008.
- [124] Amaresh C Panda, Jennifer L Martindale, Myriam Gorospe. Polysome fractionation to analyze mRNA distribution profiles. *Bio-protocol*, 7(3):e2126–e2126, 2017.

- [125] Kaleb M Pauley, Theophany Eystathioy, Andrew Jakymiw, John C Hamel, Marvin J Fritzler, Edward KL Chan. Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis. *EMBO reports*, 7(9):904–910, 2006.
- [126] Rui Peng, Jialin Zhu, Shujin Deng, Hui Shi, Shutao Xu, Hongjuan Wu, Fangdong Zou. Targeting BAX ubiquitin-binding sites reveals that BAX activation is essential for its ubiquitin-dependent degradation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 121(4):2802–2810, 2020.
- [127] Christian P Petersen, Marie-Eve Bordeleau, Jerry Pelletier, Phillip A Sharp. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular cell*, 21(4):533–542, 2006.
- [128] Ciriaco A Piccirillo, Eva Bjur, Ivan Topisirovic, Nahum Sonenberg, Ola Larsson. Translational control of immune responses: from transcripts to translatoemes. *Nature immunology*, 15(6):503–511, 2014.
- [129] Ramesh S Pillai, Suvendra N Bhattacharyya, Caroline G Artus, Tabea Zoller, Nicolas Cougot, Eugenia Basyuk, Edouard Bertrand, Witold Filipowicz. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 309(5740):1573–1576, 2005.
- [130] Ramesh S Pillai, Suvendra N Bhattacharyya, Witold Filipowicz. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in cell biology*, 17(3):118–126, 2007.
- [131] Luke Power. Beginners guide to ribosome profiling. *The Biochemist*, 44(2):30–34, 2022.
- [132] Bérengère Pradet-Balade, Florence Boulmé, Hartmut Beug, Ernst W Müllner, Jose A Garcia-Sanz. Translation control: bridging the gap between genomics and proteomics? *Trends in biochemical sciences*, 26(4):225–229, 2001.
- [133] Arvind Raghavan, Rachel L Ogilvie, Cavan Reilly, Michelle L Abelson, Shalini Raghavan, Jayprakash Vasdewani, Mitchell Krathwohl, Paul R Bohjanen. Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes. *Nucleic acids research*, 30(24):5529–5538, 2002.

- 
- [134] Christophe E Redon, Asako J Nakamura, Yong-Wei Zhang, Jiuping Ji, William M Bonner, Robert J Kinders, Ralph E Parchment, James H Doroshov, Yves Pommier. Histone  $\gamma$ H2AX and poly (ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. *Clinical cancer research*, 16(18):4532–4542, 2010.
- [135] Shlomi Reuveni, Isaac Meilijson, Martin Kupiec, Eytan Ruppim, Tamir Tuller. Genome-scale analysis of translation elongation with a ribosome flow model. *PLoS computational biology*, 7(9):e1002127, 2011.
- [136] Andrea Riba, Noemi Di Nanni, Nitish Mittal, Erik Arhné, Alexander Schmidt, Mihaela Zavolan. Protein synthesis rates and ribosome occupancies reveal determinants of translation elongation rates. *Proceedings of the national academy of sciences*, 116(30):15023–15032, 2019.
- [137] Alexander Rich, Jonathan R Warner, Howard M Goodman. The structure and function of polyribosomes. 1963.
- [138] RW Risebrough, A Tissières, JD Watson. Messenger-RNA attachment to active ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 48(3):430–436, 1962.
- [139] Mark Schena, Dari Shalon, Renu Heller, Andrew Chai, Patrick O Brown, Ronald W Davis. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20):10614–10619, 1996.
- [140] Samantha L Schuster, Andrew C Hsieh. The untranslated regions of mRNAs in cancer. *Trends in cancer*, 5(4):245–262, 2019.
- [141] Simon Scott, Juraj Szavits-Nossan. Power series method for solving TASEP-based models of mRNA translation. *Physical biology*, 17(1):015004, 2019.
- [142] Travis M Shaffer, Charles Michael Drain, Jan Grimm. Optical imaging of ionizing radiation from clinical sources. *Journal of Nuclear Medicine*, 57(11):1661–1666, 2016.
- [143] Ajeet K Sharma, Debashish Chowdhury. Stochastic theory of protein synthesis and polysome: Ribosome profile on a single mRNA transcript. *Journal of Theoretical Biology*, 289:36–46, 2011.

- [144] Daniel Shenton, Julia B Smirnova, Julian N Selley, Kathleen Carroll, Simon J Hubbard, Graham D Pavitt, Mark P Ashe, Chris M Grant. Global translational responses to oxidative stress impact upon multiple levels of protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(39):29011–29021, 2006.
- [145] Jia-yu Shi, Chu Chen, Xuan Xu, Qi Lu. miR-29a promotes pathological cardiac hypertrophy by targeting the PTEN/AKT/mTOR signalling pathway and suppressing autophagy. *Acta Physiologica*, 227(2):e13323, 2019.
- [146] Deborah Silvera, Silvia C Formenti, Robert J Schneider. Translational control in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(4):254–266, 2010.
- [147] Carrie L Simms, Benjamin H Hudson, John W Mosior, Ali S Rangwala, Hani S Zaher. An active role for the ribosome in determining the fate of oxidized mRNA. *Cell reports*, 9(4):1256–1264, 2014.
- [148] Nicole L Simone, Benjamin P Soule, David Ly, Anthony D Saleh, Jason E Savage, William DeGraff, John Cook, Curtis C Harris, David Gius, James B Mitchell. Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression. *PloS one*, 4(7):e6377, 2009.
- [149] UN Singh. Polyribosomes and unstable messenger RNA: a stochastic model of protein synthesis. *Journal of Theoretical Biology*, 25(3):444–460, 1969.
- [150] Mack Sobhany, Robin E Stanley. Polysome Profiling without Gradient Makers or Fractionation Systems. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (172):e62680, 2021.
- [151] Keith A Spriggs, Martin Bushell, Anne E Willis. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Molecular cell*, 40(2):228–237, 2010.
- [152] Vivek Srinivas, Mayank Kumar, Santosh Noronha, Swati Patankar. ORFpred: a machine learning program to identify translatable small open reading frames in intergenic regions of the Plasmodium falciparum genome. *Current Bioinformatics*, 11(2):259–268, 2016.

- 
- [153] Murray Stewart. Polyadenylation and nuclear export of mRNAs. *Journal of Biological Chemistry*, 294(9):2977–2987, 2019.
- [154] Tingzhe Sun, Dan Mu, Jun Cui. Mathematical model identifies effective P53 accumulation with target gene binding affinity in DNA damage response for cell fate decision. *Cell Cycle*, 17(24):2716–2730, 2018.
- [155] Gulshan Sunavala-Dossabhoy, Marcie Fowler, Arrigo De Benedetti. Translation of the radioresistance kinase TLK1B is induced by  $\gamma$ -irradiation through activation of mTOR and phosphorylation of 4E-BP1. *BMC molecular biology*, 5:1–10, 2004.
- [156] Juraj Szavits-Nossan, Luca Ciandrini, M Carmen Romano. Deciphering mRNA sequence determinants of protein production rate. *Physical Review Letters*, 120(12):128101, 2018.
- [157] Soroush Tahmasebi, Arkady Khoutorsky, Michael B Mathews, Nahum Sonenberg. Translation deregulation in human disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(12):791–807, 2018.
- [158] Rosette Niloufar Tamaddondoust, Yi Wang, Seyed Mehdi Jafarnejad, Tyson E Graber, Tommy Alain. The highs and lows of ionizing radiation and its effects on protein synthesis. *Cellular Signalling*, 89:110169, 2022.
- [159] Xiaohui Tan, Jin Peng, Yebo Fu, Shejuan An, Katayoon Rezaei, Sana Tabbara, Christine B Teal, Yan-gao Man, Rachel F Brem, Sidney W Fu. miR-638 mediated regulation of BRCA1 affects DNA repair and sensitivity to UV and cisplatin in triple-negative breast cancer. *Breast cancer research*, 16:1–14, 2014.
- [160] Mikiie Tanaka, P Boon Chock, Earl R Stadtman. Oxidized messenger RNA induces translation errors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(1):66–71, 2007.
- [161] Yvonne Tay, Shen Mynn Tan, Florian A Karreth, Judy Lieberman, Pier Paolo Pandolfi. Characterization of dual PTEN and p53-targeting microRNAs identifies microRNA-638/Dnm2 as a two-hit oncogenic locus. *Cell reports*, 8(3):714–722, 2014.



- [162] Sean C Taylor, Luciana K Rosselli-Murai, B elinda Crobeddu, Isabelle Plante. A critical path to producing high quality, reproducible data from quantitative western blot experiments. *Scientific Reports*, 12(1):17599, 2022.
- [163] Debrah M Thompson, Roy Parker. Stressing out over tRNA cleavage. *Cell*, 138(2):215–219, 2009.
- [164] Yunhong Tian, Miaohong Yan, Jieli Zheng, Rong Li, Jie Lin, Anan Xu, Yingying Liang, Ronghui Zheng, Yawei Yuan. miR-483-5p decreases the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells by targeting DAPK1. *Laboratory Investigation*, 99(5):602–611, 2019.
- [165] Lloyd C Trotman, Xinjiang Wang, Andrea Alimonti, Zhenbang Chen, Julie Teruya-Feldstein, Haijuan Yang, Nikola P Pavletich, Brett S Carver, Carlos Cordon-Cardo, Hediye Erdjument-Bromage, i in. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell*, 128(1):141–156, 2007.
- [166] Ingela Turesson, J orgen Carlsson, Anders Brahme, Bengt Glimelius, Bj orn Zackrisson, Bo Stenerl ow, Swedish Cancer Society Investigation Group. Biological response to radiation therapy. *Acta Oncologica*, 42(2):92–106, 2003.
- [167] Angelo Valleriani, Zoya Ignatova, Apoorva Nagar, Reinhard Lipowsky. Turnover of messenger RNA: Polysome statistics beyond the steady state. *Europhysics Letters*, 89(5):58003, 2010.
- [168] Shobha Vasudevan. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(3):311–330, 2012.
- [169] Shobha Vasudevan, Joan A Steitz. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, 128(6):1105–1118, 2007.
- [170] Christine Vogel, Raquel de Sousa Abreu, Daijin Ko, Shu-Yun Le, Bruce A Shapiro, Suzanne C Burns, Devraj Sandhu, Daniel R Boutz, Edward M Marcotte, Luiz O Penalva. Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Molecular systems biology*, 6(1):400, 2010.

- 
- [171] Christine Vogel, Edward M Marcotte. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews genetics*, 13(4):227–232, 2012.
- [172] Mechthild Wagner-Ecker, Christian Schwager, Ute Wirkner, Amir Abdollahi, Peter E Huber. MicroRNA expression after ionizing radiation in human endothelial cells. *Radiation oncology*, 5(1):1–10, 2010.
- [173] Amy Wahba, Stacey L Lehman, Philip J Tofilon. Radiation-induced translational control of gene expression. *Translation*, 5(1):e1265703, 2017.
- [174] Bingbing Wang, Tara M Love, Matthew E Call, John G Doench, Carl D Novina. Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Molecular cell*, 22(4):553–560, 2006.
- [175] Bingbing Wang, Adrienne Yanez, Novina Carl D. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14):5343–5348, 2008.
- [176] Jin-yan Wang, Qian Zhang, Dan-dan Wang, Wei Yan, Huan-huan Sha, Jian-hua Zhao, Su-jin Yang, He-da Zhang, Jun-chen Hou, Han-zi Xu, i in. MiR-29a: a potential therapeutic target and promising biomarker in tumors. *Bioscience reports*, 38(1):BSR20171265, 2018.
- [177] Juan Wang, Jinping Xu, Jiamei Fu, Dexiao Yuan, Fei Guo, Cuiping Zhou, Chunlin Shao. MiR-29a regulates radiosensitivity in human intestinal cells by targeting PTEN gene. *Radiation research*, 186(3):292–301, 2016.
- [178] Zhong Wang, Mark Gerstein, Michael Snyder. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1):57–63, 2009.
- [179] Toshiaki Watanabe, Shin-ichi Tomizawa, Kohzoh Mitsuya, Yasushi Totoki, Yasuhiro Yamamoto, Satomi Kuramochi-Miyagawa, Naoko Iida, Yuko Hoki, Patrick J Murphy, Atsushi Toyoda, i in. Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrf1 locus. *Science*, 332(6031):848–852, 2011.

- [180] Dianne Watters. Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Immunology and cell biology*, 77(3):263–271, 1999.
- [181] Shane Wiebe, Anmol Nagpal, Nahum Sonenberg. Dysregulated translational control in brain disorders: from genes to behavior. *Current opinion in genetics & development*, 65:34–41, 2020.
- [182] Bruce Wightman, Ilho Ha, Gary Ruvkun. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5):855–862, 1993.
- [183] Daniel N Wilson, Jamie H Doudna Cate. The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(5):a011536, 2012.
- [184] Richard A Woo, Melissa T Jack, Yang Xu, Sandeep Burma, David J Chen, Patrick WK Lee. DNA damage-induced apoptosis requires the DNA-dependent protein kinase, and is mediated by the latent population of p53. *The EMBO journal*, 21(12):3000–3008, 2002.
- [185] Stanisław Wrycza, Bartosz Marcinkowski, Krzysztof Wyrzykowski, CASE Narzędzia. *Język UML 2.0 w modelowaniu systemów informatycznych*. Helion, 2006.
- [186] Rong Mu Xia, Tao Liu, Wen Gang Li, Xiu Qin Xu. RNA-binding protein RBM24 represses colorectal tumorigenesis by stabilising PTEN mRNA. *Clinical and Translational Medicine*, 11(10):e383, 2021.
- [187] Jianling Xie, Eric P Kusnadi, Luc Furic, Luke A Selth. Regulation of mRNA translation by hormone receptors in breast and prostate cancer. *Cancers*, 13(13):3254, 2021.
- [188] Yihu Xie, Yi Ren. Mechanisms of nuclear mRNA export: A structural perspective. *Traffic*, 20(11):829–840, 2019.
- [189] Wenlong Xu, Anthony San Lucas, Zixing Wang, Yin Liu. Identifying microRNA targets in different gene regions. *BMC bioinformatics*, 15:1–11, 2014.

- 
- [190] Jiazhao Yan, Yuhui Qin, Jingsheng Yu, Qinghua Peng, Xiangdong Chen. MiR-340/iASPP axis affects UVB-mediated retinal pigment epithelium (RPE) cell damage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 186:9–16, 2018.
- [191] Jinliang Yang, Haitao Pu, Jian Lian, Jason Gu, Mingqu Fan. Modeling and analysis of protein synthesis and DNA mutation using colored Petri nets. *IEEE Access*, 6:22386–22400, 2018.
- [192] Ya-Ling Yang, Yen-Hsiang Chang, Chia-Jung Li, Ying-Hsien Huang, Ming-Chao Tsai, Pei-Yi Chu, Hung-Yu Lin. New insights into the role of miR-29a in hepatocellular carcinoma: Implications in mechanisms and theragnostics. *Journal of Personalized Medicine*, 11(3):219, 2021.
- [193] Yoram Zarai, Michael Margaliot, Tamir Tuller. Optimal down regulation of mRNA translation. *Scientific Reports*, 7(1):41243, 2017.
- [194] Chao Zhang, Sung-Hou Kim. Overview of structural genomics: from structure to function. *Current opinion in chemical biology*, 7(1):28–32, 2003.
- [195] He Zhang, Liang Zhang, Ang Lin, Congcong Xu, Ziyu Li, Kaibo Liu, Boxiang Liu, Xiaopin Ma, Fanfan Zhao, Huiling Jiang, i in. Algorithm for optimized mRNA design improves stability and immunogenicity. *Nature*, strong 1–3, 2023.
- [196] Jiantao Zhang, Wenli Zhou, Yanyan Liu, Tao Liu, Chenyao Li, Lei Wang. Oncogenic role of microRNA-532-5p in human colorectal cancer via targeting of the 5'UTR of RUNX3. *Oncology Letters*, 15(5):7215–7220, 2018.
- [197] Hermioni Zouridis, Vassily Hatzimanikatis. A model for protein translation: polysome self-organization leads to maximum protein synthesis rates. *Biophysical journal*, 92(3):717–730, 2007.



# Spis wybranych skrótów i symboli

- DNA (ang. *deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleinowy.
- cDNA (ang. *complementary DNA*) – zsyntezowane DNA z łańcucha RNA w reakcji katalizowanej przez enzym odwrotną transkryptazę
- RNA (ang. *ribonucleic acid*) – kwas rybonukleinowy
- mRNA (ang. *messenger ribonucleic acid*) – matrycowe RNA
- tRNA (ang. *Transfer RNA*) – transportujące RNA
- rRNA(ang. *ribosomal RNA*) – rybosomalne RNA
- cRNA (ang. *complementary RNA*) – komplementarne RNA
- piRNA (ang. *PIWI-interacting RNA*) – RNA tworzące kompleksy z białkami PIWI
- lncRNA (ang. *long non-coding RNA*) – długi, niekodujące RNA
- PTEN (ang. *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) – nazwa genu kodującego białka o tej samej nazwie
- 5'UTR/3' UTR (ang. *3'/5' untranslated region*) – region nieulegający translacji 3' lub 5'
- RP (ang. *ribosomal protein*) – białka rybosomalne
- RT-qPCR (ang. *reverse transcription quantitative real-time PCR*) – ilościowe PCR z odwrotną transkrypcją
- RNA-seq (ang. *RNA sequencing*)– sekwencjonowanie RNA

- Ribo-seq (ang. *ribosome sequencing*) – technika opisująca sekwencjonowanie miejsc chronionych przez rybosomy na mRNA
- NGS (ang. *Next-Generation Sequencing*) – Sekwencjonowanie Nowej Generacji
- ORF (ang. *Open reading frame*) – Otwarta ramka odczytu; fragment mRNA od kodonu START do kodonu STOP wraz z częściami niekodującymi
- Bp (ang. *base pairs*) – pary zasad
- RAP (ang. *ribosome affinity purification*) – oczyszczania oparte na powinowactwie do rybosomów
- TRAP (ang. *translating ribosome affinity purification*) – oczyszczania oparte na powinowactwie do rybosomów ulegających translacji
- hESC (ang. *Human Embryonic Stem Cells*) – ludzkie ambrionalne komórki macierzyste
- hFF (ang. *human foreskin fibroblast*) – fibroblasty ludzkie napletka
- Gy, mGy (ang. *Gray, miligray*) – jednostka dawki promieniowania
- Sv, mSv (ang. *Sievert, millisievert*) – jednostka odnosząca się do działania promieniowania jonizującego na organizmy żywe
- RFT – reaktywne formy tlenu
- SSB (ang. *single-strand break*) – pojedynczoniciowe pęknięcia DNA
- DSB (ang. *double-strand break*) – podwójnoniciowe pęknięcia DNA
- IR (ang. *ionising radiation*) – promieniowanie jonizujące
- mRNP (ang. *messenger ribonucleoprotein*) – mRNA z przyłączonymi białkami
- ODE (ang. *ordinary differential equations*) – równania różniczkowe zwyczajne
- RDS (ang. *ribosome docking site*) – miejsce wiązania się rybosomu

- RRS (ang. *ribosome-recognizing sequence*) – sekwencja mRNA rozpoznawana przez rybosom
- TASEP (ang. *totally assymetric single exclusion model*) – Całkowicie asymetryczny prosty proces wykluczania; metoda modelowania matematycznego
- RFM (ang. *ribosome flow model*) – Model przepływu rybosomów
- PN (ang. *Petri nets*) – Sieci Petriego
- CPN (ang. *colored Petri nets*) – kolorowane sieci Petriego
- PCR (ang. *Polymerase chain reaction*) – reakcja łańcuchowa polimerazy
- FBS (ang. *Fetal bovine serum*) – surowica bydlęca
- DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) – medium hodowlane
- CHX (ang. *Cycloheximide*) – cykloheksimid
- LB (ang. *Loading buffer*) – bufor obciążający
- TBST (ang. *tris-buffered saline with Tween*) – roztwór soli fizjologicznej z dodatkiem detergentu (Tween)
- FSM (ang. *Finite State Machine*) – skończona maszyna stanowa





# Spis rysunków

3.1	Reprezentacja graficzna Sieci Petriego. Przedstawiono zasadę przejścia z jednego miejsca do drugiego na podstawie syntezy wody. . . . .	32
4.1	Schemat procedury eksperymentalnej. Ścieżka z punktami oznaczonymi gwiazdką dotyczy procedury oznaczania białek, natomiast bez gwiazdki dotyczy ścieżki oznaczania mRNA oraz mikroRNA. . . . .	36
4.2	Schemat procesu tworzenia gradientu sacharozowego w probówce do ultrawierowania. Rysunek wykonano w aplikacji BioRender. . . . .	37
4.3	Wykres przedstawiający wartości stężenia RNA w gradiencie sacharozowym. . . . .	39
5.1	Przykładowy schemat działania maszyny stanowej przedstawiony dla trzech aminokwasów. Po lewej stronie przedstawiono fragment łańcucha. Strzałki nad poszczególnymi segmentami przedstawiają położenie głowicy (a dokładnie – miejsca wiążącego w rybosomie). Kolory strzałek oraz numery korespondują z tabelą przejść przedstawioną po prawej stronie. . . . .	47
5.2	Uproszczony schemat działania modelu translacji. . . . .	53
6.1	Porównanie udziałów frakcji dla transkryptu p53 (a) oraz miR638 (b) w warunkach kontrolnych oraz po napromieniowaniu w dawce 4 Gy. . . .	60
6.2	Poziomy ekspresji dla totalnego miR638 (a) oraz transkryptu (b) i białka (c) P53. . . . .	61
6.3	Porównanie udziałów frakcji dla transkryptu PTEN (a) oraz miR638 (b) w warunkach kontrolnych oraz po napromieniowaniu w dawce 4 Gy. . .	63

---

6.4	Eksperymentalnie zmierzone całkowite poziomy ekspresji dla miR638 oraz transkryptu i białka PTEN. . . . .	64
6.5	Porównanie udziałów frakcji dla transkryptu PTEN (a) oraz miR29a (b) w warunkach kontrolnych oraz po napromieniowaniu w dawce 4 Gy. . .	65
6.6	Eksperymentalnie zmierzone całkowite poziomy ekspresji dla miR29a oraz transkryptu i białka PTEN. . . . .	66
6.7	Poziom białka we frakcji DUŻA PODJEDNOSTKA + MONOSOM, w zależności od siły oddziaływania mechanizmów (M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA. . . . .	67
6.8	Poziom białka we frakcji LEKKIE POLISOMY, w zależności od siły oddziaływania mechanizmów (M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA. . . . .	68
6.9	Poziom białka we frakcji CIĘŻKIE POLISOMY, w zależności od siły oddziaływania mechanizmów (M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA. . . . .	69
6.10	Poziom mRNA w zależności od siły oddziaływania mechanizmu M4. . . . .	69
6.11	Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) p53 w warunkach kontrolnych. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 625 miejscu oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych. . . . .	71
6.12	Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) p53 po upływie czterech godzin od napromieniowania. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 625 miejscu oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych. . . . .	72
6.13	Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) p53 po upływie dwunastu godzin od napromieniowania. . . . .	73

- 
- 6.14 Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) PTEN w warunkach kontrolnych. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 i 625 miejscu, oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych. . . . . 75
- 6.15 Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) PTEN po upływie czterech godzin od napromieniowania. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 i 625 miejscu, oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych. . . . . 76
- 6.16 Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) PTEN po upływie dwunastu godzin od napromieniowania. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 i 625 miejscu, oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych. . . . . 77
- 6.17 Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) PTEN w warunkach kontrolnych. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 i 625 miejscu, oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych. . . . . 78
- 6.18 Zestawienie wyników symulacji dla białka (górny rysunek) i transkryptu (dolny rysunek) PTEN po upływie czterech godzin od napromieniowania. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 i 625 miejscu, oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych. . . . . 79

- 6.19 Zestawienie wyników symulacji dla transkryptu PTEN po upływie dwunastu godzin od napromieniowania. Przedstawiono przebiegi dla symulacji znajdujących się na liście rankingowej na 1, 10, 100 i 625 miejscu, oraz dla przebiegu bez żadnej regulacji. Czarną poziomą linią zaznaczono względny poziom ekspresji otrzymany z wyników eksperymentalnych. . 80

# Spis tablic

2.1	Proponowane mechanizmy działania mikroRNA. Na podstawie [114] . . .	19
2.2	Rodzaje promieniowania jonizującego w kolejności rosnącej energii. Na podstawie [158] . . . . .	24
3.1	Zestawienie wszystkich przedstawionych w pracy modeli ze względu na typ modelowania. . . . .	33
4.1	Sekwencje starterów. Transkrypt GAPDH oraz SNORD44 posłużyły jako referencje. . . . .	41
5.1	Tabela kodonów oraz odpowiadających im czasom przyłączenia się tRNA. Czerwonym kolorem zaznaczono kodony STOP. . . . .	48
5.2	Znaczenie symboli opisujących maszyny stanowe i ich biologiczne analogi w modelu translacji . . . . .	49
5.3	Podział rybosomów na frakcje. . . . .	51
5.4	Przykładowa tabela opisująca losowanie liczby rybosomów z zadanego profilu polisomalnego. . . . .	51
5.5	Tabela przedstawiająca zaproponowane współczynniki degradacji transkryptów oraz białek. . . . .	54
6.1	Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla kontroli. $\Delta$ – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA. . . . .	71

- 6.2 Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu p53 – IR 4h.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA. . . . . 72
- 6.3 Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu p53 – IR 12h.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA. . . . . 73
- 6.4 Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu PTEN dla kontroli.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA. . . . . 75
- 6.5 Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu PTEN – IR4h.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA. . . . . 76
- 6.6 Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu PTEN – IR12h.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA. . . . . 77

- 
- 6.7 Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oddziaływania miR29a oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu PTEN dla kontroli.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA. . . . . 78
- 6.8 Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu PTEN – IR 4h.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA. . . . . 79
- 6.9 Tabela rankingowa przedstawiająca kombinacje mechanizmów oraz stopień dopasowania do danych eksperymentalnych dla białka i transkryptu PTEN – IR 12h.  $\Delta$  – wartość różnicy błędu, na podstawie równania 5.5, M1 – zahamowanie inicjacji translacji, M2 – Wydłużenie czasu elongacji translacji, M3 – Przedwczesne odłączenie się rybosomu, M4 – Degradacja mRNA. . . . . 80
- 8.1 Pełna tabela przejść zaproponowanej maszyny stanowej. Kolorem czerwonym zaznaczono kodony STOP, a zielonym kodon START. . . . . XXXIX
- 8.1 Pełna tabela przejść zaproponowanej maszyny stanowej. Kolorem czerwonym zaznaczono kodony STOP, a zielonym kodon START. . . . . XL
- 8.1 Pełna tabela przejść zaproponowanej maszyny stanowej. Kolorem czerwonym zaznaczono kodony STOP, a zielonym kodon START. . . . . XLI
- 8.2 Pełna tabela rankingowa dla wszystkich kombinacji mechanizmów wykorzystanych w modelu. . . . . XLII





# Suplement

Tablica 8.1: Pełna tabela przejść zaproponowanej maszyny stanowej. Kolorem czerwonym zaznaczono kodony STOP, a zielonym kodon START.

Obecny stan maszyny	Symbol na taśmie	Nowy stan maszyny	Kierunek przesunięcia się głowicy
∅	A	A	→
∅	U	U	→
∅	G	G	→
∅	C	C	→
A	A	AA	→
A	U	AU	→
A	G	AG	→
A	C	AC	→
U	A	UA	→
U	U	UU	→
U	G	UG	→
U	C	UC	→
G	A	GA	→
G	U	GU	→
G	G	GG	→
G	C	GC	→
C	A	CA	→
C	U	CU	→
C	G	CG	→
C	C	CC	→
AA	A	AAA	○
AA	U	AAU	○
AA	G	AAG	○
AA	C	AAC	○
AU	A	AUA	○
AU	U	AUU	○
AU	G	AUG	○
AU	C	AUC	○
AG	A	AGA	○
AG	U	AGU	○
AG	G	AGG	○
AG	C	AGC	○
AC	A	ACA	○
AC	U	ACU	○
AC	G	ACG	○
AC	C	ACC	○
UA	A	UAA	STOP
UA	U	UAU	○
UA	G	UAG	STOP
UA	C	UAC	○

Tablica 8.1: Pełna tabela przejść zaproponowanej maszyny stanowej. Kolorem czerwonym zaznaczono kodony STOP, a zielonym kodon START.

Obecny stan maszyny	Symbol na taśmie	Nowy stan maszyny	Kierunek przesunięcia się głowicy
UU	A	UUA	○
UU	U	UUU	○
UU	G	UUG	○
UU	C	UUC	○
UG	A	UGA	STOP
UG	U	UGU	○
UG	G	UGG	○
UG	C	UGC	○
UC	A	UCA	○
UC	U	UCU	○
UC	G	UCG	○
UC	C	UCC	○
GA	A	GAA	○
GA	U	GAU	○
GA	G	GAG	○
GA	C	GAC	○
GU	A	GUA	○
GU	U	GUU	○
GU	G	GUG	○
GU	C	GUC	○
GG	A	GGA	○
GG	U	GGU	○
GG	G	GGG	○
GG	C	GGC	○
GC	A	GCA	○
GC	U	GCU	○
GC	G	GCG	○
GC	C	GCC	○
CA	A	CAA	○
CA	U	CAU	○
CA	G	CAG	○
CA	C	CAC	○
CU	A	CUA	○
CU	U	CUU	○
CU	G	CUG	○
CU	C	CUC	○
AAA	A/U/G/C	∅	→
AAU	A/U/G/C	∅	→
AAG	A/U/G/C	∅	→
AAC	A/U/G/C	∅	→
AUA	A/U/G/C	∅	→
AUU	A/U/G/C	∅	→
AUG	A/U/G/C	∅ (START)	→
AUC	A/U/G/C	∅	→
AGA	A/U/G/C	∅	→
AGU	A/U/G/C	∅	→
AGG	A/U/G/C	∅	→
AGC	A/U/G/C	∅	→
ACA	A/U/G/C	∅	→
ACU	A/U/G/C	∅	→
ACG	A/U/G/C	∅	→
ACC	A/U/G/C	∅	→
UAA	-	-	Nie dotyczy
UAU	A/U/G/C	∅	→
UAG	-	-	Nie dotyczy
UAC	A/U/G/C	∅	→
UUA	A/U/G/C	∅	→

Tablica 8.1: Pełna tabela przejść zaproponowanej maszyny stanowej. Kolorem czerwonym zaznaczono kodony STOP, a zielonym kodon START.

Obecny stan maszyny	Symbol na taśmie	Nowy stan maszyny	Kierunek przesunięcia się głowicy
UUU	A/U/G/C	∅	→
UUG	A/U/G/C	∅	→
UUC	A/U/G/C	∅	→
UGA	-	-	Nie dotyczy
UGU	A/U/G/C	∅	→
UGG	A/U/G/C	∅	→
UGC	A/U/G/C	∅	→
UCA	A/U/G/C	∅	→
UCU	A/U/G/C	∅	→
UCG	A/U/G/C	∅	→
UCC	A/U/G/C	∅	→
GAA	A/U/G/C	∅	→
GAU	A/U/G/C	∅	→
GAG	A/U/G/C	∅	→
GAC	A/U/G/C	∅	→
GUA	A/U/G/C	∅	→
GUU	A/U/G/C	∅	→
GUG	A/U/G/C	∅	→
GUC	A/U/G/C	∅	→
GGA	A/U/G/C	∅	→
GGU	A/U/G/C	∅	→
GGG	A/U/G/C	∅	→
GGC	A/U/G/C	∅	→
GCA	A/U/G/C	∅	→
GCU	A/U/G/C	∅	→
GCG	A/U/G/C	∅	→
GCC	A/U/G/C	∅	→
CAA	A/U/G/C	∅	→
CAU	A/U/G/C	∅	→
CAG	A/U/G/C	∅	→
CAC	A/U/G/C	∅	→
CUA	A/U/G/C	∅	→
CUU	A/U/G/C	∅	→
CUG	A/U/G/C	∅	→
CUC	A/U/G/C	∅	→

Tablica 8.2: Pełna tabela rankingowa dla wszystkich kombinacji mechanizmów wykorzystanych w modelu.

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
1.	0,0016	0,25	0,25	0,25	0,75
2.	0,0024	0,5	0	0,5	0,75
3.	0,0131	0	0	1	0,75
4.	0,0184	0,75	0,25	0	0,75
5.	0,0452	0	0,5	0	0,75
6.	0,0489	1	0	0,25	0,75
7.	0,0497	0,25	0	0,75	0,75
8.	0,0498	0	0,25	0,25	0,75
9.	0,0572	0,75	0	0,25	0,75
10.	0,0622	0	0,25	0,5	0,75
11.	0,0650	0,5	0,25	0	0,75
12.	0,0767	0,75	0	0,5	0,75
13.	0,0840	0,5	0	0,75	0,75
14.	0,0848	1	0	0	1
15.	0,0858	0,25	0	1	0,75
16.	0,0876	1	0,25	0	0,75
17.	0,0905	0,75	0	0,5	0,5
18.	0,0906	0,5	0	0,75	0,5
19.	0,0928	0,25	0	1	0,5
20.	0,0933	1	0,25	0	0,5
21.	0,0978	1	0	0	0,75
22.	0,0999	0,5	0,25	0	0,5
23.	0,0999	0	0,25	0,5	0,5
24.	0,1110	0,75	0	0,25	1
25.	0,1152	0,25	0,25	0,5	0,75
26.	0,1174	1	0	0,25	0,5
27.	0,1182	0	0,5	0	0,5
28.	0,1195	0,5	0	0,25	1
29.	0,1210	0,25	0	0,75	1
30.	0,1215	0	0,25	0,25	1
31.	0,1219	0,25	0,25	0,5	0,5
32.	0,1275	0,25	0	0,5	1
33.	0,1295	0,75	0	0,75	0,75
34.	0,1328	0,5	0	0,25	0,75

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
35.	0,1363	0,25	0,25	0	1
36.	0,1386	0,25	0,5	0	0,75
37.	0,1397	0,75	0	0,75	0,5
38.	0,1405	0,75	0,25	0,25	0,75
39.	0,1407	0,25	0	0,5	0,75
40.	0,1408	0	0,25	0,75	0,75
41.	0,1445	0	0	0,75	1
42.	0,1484	0,75	0,25	0	0,5
43.	0,1492	0,25	0,25	0	0,75
44.	0,1498	0,25	0,5	0	0,5
45.	0,1519	0,75	0,25	0,25	0,5
46.	0,1523	0	0,25	0,75	0,5
47.	0,1550	0	0	1	1
48.	0,1559	1	0	0,5	0,75
49.	0,1592	0	0	0,75	0,75
50.	0,1593	0	0,5	0,25	0,75
51.	0,1644	0,5	0	0,5	1
52.	0,1673	0,25	0,25	0,25	0,5
53.	0,1682	0,25	0,25	0,75	0,75
54.	0,1686	1	0	0,5	0,5
55.	0,1688	0,5	0	0,5	0,5
56.	0,1692	0,25	0,25	0,25	1
57.	0,1697	0	0,25	0,75	0,25
58.	0,1707	0,75	0,25	0,25	0,25
59.	0,1723	0	0,5	0,25	0,5
60.	0,1740	0,25	0,5	0	0,25
61.	0,1784	0,5	0	1	0,75
62.	0,1794	0,25	0,25	0,75	0,5
63.	0,1808	0	0	1	0,5
64.	0,1813	1	0	0,5	0,25
65.	0,1819	0,75	0,25	0	1
66.	0,1853	0	0,5	0,25	0,25
67.	0,1856	0	0,25	0	1
68.	0,1866	0,75	0	0,75	0,25
69.	0,1867	0,5	0,25	0,25	0,75
70.	0,1893	0,75	0	0	1
71.	0,1930	0,5	0	1	0,5
72.	0,1931	0,25	0,25	0,75	0,25
73.	0,1939	0,75	0,5	0	0,75

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
74.	0,1973	1	0,25	0,25	0,75
75.	0,2015	0,5	0,25	0,25	0,5
76.	0,2015	0,25	0,25	0,5	0,25
77.	0,2029	1	0	0,75	0,75
78.	0,2032	0	0,25	0	0,75
79.	0,2051	1	0	0,25	1
80.	0,2056	0,5	0,5	0	0,75
81.	0,2075	0,5	0	1	0,25
82.	0,2087	0	0,5	0	1
83.	0,2099	0,75	0,5	0	0,5
84.	0,2122	1	0,25	0,25	0,5
85.	0,2161	0,75	0	0	0,75
86.	0,2163	0,5	0,25	0,25	0,25
87.	0,2176	0	0	0,5	1
88.	0,2196	1	0	0,75	0,5
89.	0,2201	0,25	0	0,75	0,5
90.	0,2203	1	0,5	0	0,75
91.	0,2208	0	0,25	0,25	0,5
92.	0,2219	0,5	0,25	0	1
93.	0,2220	0,5	0,5	0	0,5
94.	0,2237	0	0,25	0,5	1
95.	0,2251	0,75	0	0,25	0,5
96.	0,2252	0,75	0	0,5	1
97.	0,2258	0,75	0,5	0	0,25
98.	0,2282	1	0,25	0,25	0,25
99.	0,2329	1	0,25	0	0,25
100.	0,2341	0,25	0	1	0,25
101.	0,2362	1	0	0,75	0,25
102.	0,2368	0	0,25	1	0,75
103.	0,2368	0,5	0	0,75	0,25
104.	0,2383	1	0,5	0	0,5
105.	0,2385	0,5	0,5	0	0,25
106.	0,2390	0	0	0,5	0,75
107.	0,2405	0,75	0,25	0,5	0,75
108.	0,2417	0,5	0	0,75	1
109.	0,2438	0,25	0	1	1
110.	0,2480	0,25	0	0,25	1
111.	0,2481	0,75	0	0,5	0,25
112.	0,2482	0,25	0,75	0	0,75

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
113.	0,2483	1	0,25	0	1
114.	0,2486	0,25	0,5	0,25	0,75
115.	0,2528	1	0	0,75	0
116.	0,2549	0,5	0,5	0	0
117.	0,2558	1	0,25	0,25	0
118.	0,2563	1	0,5	0	0,25
119.	0,2563	0	0,25	1	0,5
120.	0,2566	0,75	0	1	0,75
121.	0,2583	0,75	0,5	0	0
122.	0,2602	0,75	0,25	0,5	0,5
123.	0,2605	0,5	0,25	0	0,25
124.	0,2614	0	0,25	0,5	0,25
125.	0,2631	0	0,5	0,5	0,75
126.	0,2639	0,25	0,75	0	0,5
127.	0,2661	0,5	0	0	1
128.	0,2671	0	0,75	0	0,75
129.	0,2689	0,25	0,5	0,25	0,5
130.	0,2689	0,5	0,25	0,25	0
131.	0,2705	1	0	0	0,5
132.	0,2710	0,25	0,25	1	0,75
133.	0,2722	0,25	0	0,25	0,75
134.	0,2737	0,75	0	0,75	1
135.	0,2739	0,25	0,25	0,5	1
136.	0,2743	1	0,5	0	0
137.	0,2759	0	0,25	1	0,25
138.	0,2767	0,5	0,25	0,5	0,75
139.	0,2772	0,75	0	1	0,5
140.	0,2780	0,5	0	1	0
141.	0,2784	1	0	0,25	0,25
142.	0,2799	0,75	0,25	0,5	0,25
143.	0,2803	0,75	0,25	0,75	0,75
144.	0,2813	0	0,5	0	0,25
145.	0,2842	0,25	0,75	0	0,25
146.	0,2847	0	0,5	0,5	0,5
147.	0,2879	0,25	0,5	0	1
148.	0,2887	0	0,75	0	0,5
149.	0,2892	0,25	0,5	0,25	0,25
150.	0,2909	0,25	0,25	1	0,5
151.	0,2910	1	0,5	0,25	0,75

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
152.	0,2928	0,5	0	0	0,75
153.	0,2932	1	0,25	0,5	0,75
154.	0,2933	0,25	0,25	0,75	0
155.	0,2939	0,75	0,25	0,25	1
156.	0,2954	0	0,25	1	0
157.	0,2957	0	0,25	0,75	1
158.	0,2978	0,75	0	1	0,25
159.	0,2990	0,5	0,25	0,5	0,5
160.	0,2997	0,75	0,25	0,5	0
161.	0,3009	0,5	0,75	0	0,75
162.	0,3017	0	0,5	0,25	0
163.	0,3032	1	0	0,5	1
164.	0,3034	0,75	0,25	0,75	0,5
165.	0,3046	0,25	0,75	0	0
166.	0,3059	1	0	0,5	0
167.	0,3060	0,5	0,5	0,25	0,75
168.	0,3064	0	0,5	0,5	0,25
169.	0,3095	0,25	0,5	0,25	0
170.	0,3101	0,5	0	0,25	0,5
171.	0,3103	0	0,75	0	0,25
172.	0,3106	0	0,5	0,75	0,75
173.	0,3119	0,75	0,5	0,25	0,75
174.	0,3123	1	0	1	0,75
175.	0,3131	0,25	0,25	1	0,25
176.	0,3132	0	0,5	0,25	1
177.	0,3132	0,75	0,25	0	0,25
178.	0,3150	1	0,5	0,25	0,5
179.	0,3161	1	0,25	0,5	0,5
180.	0,3166	0,75	0,75	0	0,75
181.	0,3184	0,75	0	1	0
182.	0,3186	0,25	0	0,5	0,5
183.	0,3203	0,5	0,25	0,75	0,75
184.	0,3213	0,5	0,25	0,5	0,25
185.	0,3225	0,25	0,25	0,75	1
186.	0,3246	0	0,25	0,75	0
187.	0,3249	0,5	0,75	0	0,5
188.	0,3253	0,75	0,25	0,25	0
189.	0,3264	0,75	0,25	0,75	0,25
190.	0,3273	0,25	0,25	0	0,5

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
191.	0,3277	0,25	0,5	0	0
192.	0,3281	0	0,5	0,5	0
193.	0,3282	0,5	0	1	1
194.	0,3297	0,25	0,75	0,25	0,75
195.	0,3306	0,25	0,5	0,5	0,75
196.	0,3309	0,5	0,5	0,25	0,5
197.	0,3318	0	0,75	0	0
198.	0,3335	0,5	0,25	0,25	1
199.	0,3351	0,5	0	0,5	0,25
200.	0,3352	0,25	0,25	0,25	0,25
201.	0,3354	0,25	0,25	1	0
202.	0,3363	0	0,5	0,75	0,5
203.	0,3376	0,75	0,5	0,25	0,5
204.	0,3380	1	0	1	0,5
205.	0,3389	1	0,5	0,25	0,25
206.	0,3391	0	0	0,75	0,5
207.	0,3399	0,75	0	0,75	0
208.	0,3402	1	0,25	0,5	0,25
209.	0,3412	0,75	0,75	0	0,5
210.	0,3432	0,75	0,5	0	1
211.	0,3436	0,5	0,25	0,5	0
212.	0,3452	1	0,25	0,75	0,75
213.	0,3463	0,5	0,25	0,75	0,5
214.	0,3465	1	0	0,75	1
215.	0,3483	0	0	1	0,25
216.	0,3485	0	0,75	0,25	0,75
217.	0,3487	1	0,25	0,25	1
218.	0,3493	1	0,75	0	0,75
219.	0,3494	0,75	0,25	0,75	0
220.	0,3498	0,5	0,75	0	0,25
221.	0,3523	0,25	0,75	0,25	0,5
222.	0,3538	0,5	0,5	0	1
223.	0,3558	0,5	0,5	0,25	0,25
224.	0,3577	0,25	0,5	0,5	0,5
225.	0,3598	0,25	0,25	0,5	0
226.	0,3600	0	0	0,25	1
227.	0,3620	0	0,5	0,75	0,25
228.	0,3628	1	0,5	0,25	0
229.	0,3634	0,75	0,5	0,25	0,25

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
230.	0,3636	1	0	1	0,25
231.	0,3643	1	0,25	0,5	0
232.	0,3676	0,75	0,75	0	0,25
233.	0,3686	0,75	0,25	1	0,75
234.	0,3689	1	0,5	0	1
235.	0,3695	0	1	0	0,75
236.	0,3722	0,5	0,25	0,75	0,25
237.	0,3726	1	0,25	0,75	0,5
238.	0,3747	0,5	0,75	0	0
239.	0,3768	0	0,75	0,25	0,5
240.	0,3780	1	0,75	0	0,5
241.	0,3794	0,25	0,5	0,75	0,75
242.	0,3795	0,25	0,75	0,25	0,25
243.	0,3805	0,5	0,5	0,5	0,75
244.	0,3806	0,5	0,5	0,25	0
245.	0,3806	0,75	0,5	0,5	0,75
246.	0,3837	0	0,25	1	1
247.	0,3848	0,25	0,5	0,5	0,25
248.	0,3855	0,75	0,25	0,5	1
249.	0,3870	0	0,25	0	0,5
250.	0,3876	0	0,5	0,75	0
251.	0,3878	0,5	0,75	0,25	0,75
252.	0,3888	0,25	0,5	0,25	1
253.	0,3891	0,75	0,5	0,25	0
254.	0,3892	1	0	1	0
255.	0,3903	0,25	0	0,75	0,25
256.	0,3904	0,75	0	1	1
257.	0,3913	1	0,5	0,5	0,75
258.	0,3916	0	0,25	0,25	0,25
259.	0,3921	0	0,5	1	0,75
260.	0,3929	0,75	0	0,25	0,25
261.	0,3930	1	0,25	0	0
262.	0,3932	0,25	0	1	0
263.	0,3939	0,75	0,75	0	0
264.	0,3943	0	0	0,25	0,75
265.	0,3961	0,5	0	0,75	0
266.	0,3965	0,25	0,75	0	1
267.	0,3970	0,75	0	0	0,5
268.	0,3981	0,5	0,25	0,75	0

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
269.	0,3990	0,75	0,25	1	0,5
270.	0,3995	0	1	0	0,5
271.	0,4010	1	0,25	0,75	0,25
272.	0,4024	0,5	1	0	0,75
273.	0,4049	0	0,75	0	1
274.	0,4051	0	0,75	0,25	0,25
275.	0,4056	0,75	0	0,5	0
276.	0,4061	0,75	1	0	0,75
277.	0,4067	1	0,75	0	0,25
278.	0,4068	0,25	0,75	0,25	0
279.	0,4080	0,75	0,75	0,25	0,75
280.	0,4082	0	0,5	0,5	1
281.	0,4105	0,25	0,5	0,75	0,5
282.	0,4116	0,5	0,5	0,5	0,5
283.	0,4119	0,25	0,5	0,5	0
284.	0,4121	0,75	0,5	0,5	0,5
285.	0,4123	0,5	0,25	1	0,75
286.	0,4140	0,75	0,5	0,75	0,75
287.	0,4150	0,25	0,75	0,5	0,75
288.	0,4160	0,5	0,25	0,5	1
289.	0,4166	0,25	0,25	1	1
290.	0,4191	0,5	0,75	0,25	0,5
291.	0,4195	0,25	0	0	1
292.	0,4204	1	0,25	1	0,75
293.	0,4211	0,5	0,25	0	0
294.	0,4220	0,75	0,25	0,75	1
295.	0,4229	0	0,25	0,5	0
296.	0,4236	1	0,5	0,5	0,5
297.	0,4246	0	0,5	1	0,5
298.	0,4256	0	0	0,5	0,5
299.	0,4274	0,25	1	0	0,75
300.	0,4294	0,75	0,25	1	0,25
301.	0,4295	1	0,25	0,75	0
302.	0,4295	0	1	0	0,25
303.	0,4302	1	0,75	0,25	0,75
304.	0,4307	0	0,75	0,5	0,75
305.	0,4333	0,5	0,5	0,75	0,75
306.	0,4334	0	0,75	0,25	0
307.	0,4337	1	0,5	0,25	1



Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
308.	0,4354	1	0,75	0	0
309.	0,4357	0,5	1	0	0,5
310.	0,4365	1	0,25	0,5	1
311.	0,4390	0,75	1	0	0,5
312.	0,4393	1	0,5	0,75	0,75
313.	0,4394	1	0	0,25	0
314.	0,4402	0,75	0,75	0,25	0,5
315.	0,4416	0,25	0,5	0,75	0,25
316.	0,4427	0,5	0,5	0,5	0,25
317.	0,4432	1	0	0	0,25
318.	0,4433	0,5	0,75	0	1
319.	0,4436	0,75	0,5	0,5	0,25
320.	0,4444	0	0,5	0	0
321.	0,4448	0,25	0,75	0,5	0,5
322.	0,4458	0,5	0,5	0,25	1
323.	0,4459	0,5	0,25	1	0,5
324.	0,4466	0	1	0,25	0,75
325.	0,4468	1	0	1	1
326.	0,4483	0,75	0,5	0,75	0,5
327.	0,4508	0,5	0,75	0,5	0,75
328.	0,4512	0,75	0,5	0,25	1
329.	0,4513	0,5	0,75	0,25	0,25
330.	0,4518	0	0,5	0,75	1
331.	0,4541	1	0,25	1	0,5
332.	0,4559	1	0,5	0,5	0,25
333.	0,4560	0,5	0,25	0,75	1
334.	0,4569	0,25	0,75	0,75	0,75
335.	0,4570	0	0,5	1	0,25
336.	0,4579	0,75	0,75	0	1
337.	0,4593	0,25	0	0	0,75
338.	0,4595	0	1	0	0
339.	0,4598	0,75	0,25	1	0
340.	0,4610	0,25	0	0,25	0,5
341.	0,4619	0,25	1	0	0,5
342.	0,4637	0,25	0,5	1	0,75
343.	0,4641	0,25	0,5	0,5	1
344.	0,4656	1	0,75	0,25	0,5
345.	0,4658	0	0,75	0,5	0,5
346.	0,4689	0,5	0,5	0,75	0,5

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
347.	0,4689	0,5	1	0	0,25
348.	0,4705	0	0,75	0,75	0,75
349.	0,4711	0,25	0,75	0,25	1
350.	0,4727	0,75	1	0	0,25
351.	0,4727	0,25	0,5	0,75	0
352.	0,4732	1	1	0	0,75
353.	0,4738	0,5	0,5	0,5	0
354.	0,4742	0,75	0,75	0,25	0,25
355.	0,4749	0,75	0,75	0,5	0,75
356.	0,4751	0,75	0,5	0,5	0
357.	0,4756	1	0,5	0,75	0,5
358.	0,4780	0,75	0,25	0	0
359.	0,4792	0,25	0,75	0,5	0,25
360.	0,4795	0,5	0,25	1	0,25
361.	0,4795	0	0,75	0,25	1
362.	0,4805	0,75	1	0,25	0,75
363.	0,4825	0,75	0,5	0,75	0,25
364.	0,4830	0	1	0,25	0,5
365.	0,4835	0,5	0	0	0,5
366.	0,4835	0,5	0,75	0,25	0
367.	0,4841	1	0,25	0,75	1
368.	0,4854	1	0,75	0	1
369.	0,4857	0,5	1	0,25	0,75
370.	0,4872	0,5	0	0,25	0,25
371.	0,4874	0,5	0,75	0,5	0,5
372.	0,4882	1	0,5	0,5	0
373.	0,4888	1	0,25	1	0,25
374.	0,4895	0	0,5	1	0
375.	0,4902	0,25	0,75	0,75	0,5
376.	0,4911	0,5	0,5	1	0,75
377.	0,4913	1	0,75	0,5	0,75
378.	0,4928	0,75	0,75	0,75	0,75
379.	0,4933	0,75	0,5	1	0,75
380.	0,4950	0,5	0,75	0,75	0,75
381.	0,4963	0,25	1	0	0,25
382.	0,4964	0,25	0	0,5	0,25
383.	0,4981	0	1	0	1
384.	0,5009	0	0,75	0,5	0,25
385.	0,5011	1	0,75	0,25	0,25

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
386.	0,5014	0,5	0	0,5	0
387.	0,5018	0,25	0,5	1	0,5
388.	0,5020	0,25	1	0,25	0,75
389.	0,5022	0,5	1	0	0
390.	0,5029	0,75	0,25	1	1
391.	0,5030	0,25	0,25	0,25	0
392.	0,5044	0,5	0,5	0,75	0,25
393.	0,5063	0,75	1	0	0
394.	0,5076	0,25	0,25	0	0,25
395.	0,5082	0,75	0,75	0,25	0
396.	0,5088	0,25	0,5	0,75	1
397.	0,5089	0	0,75	0,75	0,5
398.	0,5116	1	1	0	0,5
399.	0,5120	1	0,5	0,75	0,25
400.	0,5124	0	1	0,5	0,75
401.	0,5127	0,75	0,75	0,5	0,5
402.	0,5130	0,5	0,25	1	0
403.	0,5137	0,25	0,75	0,5	0
404.	0,5140	0,5	0,5	0,5	1
405.	0,5143	0,75	0,5	0,5	1
406.	0,5158	0	0	1	0
407.	0,5165	1	0,5	1	0,75
408.	0,5168	0,75	0,5	0,75	0
409.	0,5188	0	0	0,75	0,25
410.	0,5193	0	1	0,25	0,25
411.	0,5198	0,75	1	0,25	0,5
412.	0,5229	0,5	0,75	0,25	1
413.	0,5236	1	0,25	1	0
414.	0,5249	0,5	0,75	0,5	0,25
415.	0,5255	1	0,5	0,5	1
416.	0,5259	0,5	1	0,25	0,5
417.	0,5264	0	0,5	1	1
418.	0,5270	0,25	0,75	1	0,75
419.	0,5282	0,25	0,75	0,75	0,25
420.	0,5308	0,25	1	0	0
421.	0,5314	0,5	0,5	1	0,5
422.	0,5319	1	0,75	0,5	0,5
423.	0,5321	0,75	0,75	0,75	0,5
424.	0,5322	0,5	1	0,5	0,75

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
425.	0,5342	0,75	0,5	1	0,5
426.	0,5344	0,5	1	0	1
427.	0,5353	0,5	0,75	0,75	0,5
428.	0,5360	0	0,75	0,5	0
429.	0,5365	1	0,75	0,25	0
430.	0,5375	0,75	1	0,5	0,75
431.	0,5396	1	0,75	0,75	0,75
432.	0,5396	0,75	1	0	1
433.	0,5399	0,5	0,5	0,75	0
434.	0,5399	0,25	0,5	1	0,25
435.	0,5403	0,5	0,25	1	1
436.	0,5407	1	1	0,25	0,75
437.	0,5415	0,75	0,75	0,25	1
438.	0,5427	0,25	1	0,25	0,5
439.	0,5448	0,75	0,5	0,75	1
440.	0,5472	0	0,75	0,75	0,25
441.	0,5483	1	0,5	0,75	0
442.	0,5487	0	0	0	1
443.	0,5491	0,25	0,75	0,5	1
444.	0,5500	1	1	0	0,25
445.	0,5517	0,25	1	0	1
446.	0,5523	0,75	0,75	0,5	0,25
447.	0,5530	1	0,25	1	1
448.	0,5537	0	0,75	1	0,75
449.	0,5542	0	1	0,5	0,5
450.	0,5549	0	0,75	0,5	1
451.	0,5556	0	1	0,25	0
452.	0,5580	0	1	0,75	0,75
453.	0,5593	1	0,5	1	0,5
454.	0,5595	1	0,75	0,25	1
455.	0,5596	0,75	1	0,25	0,25
456.	0,5605	0,25	0	0,75	0
457.	0,5606	0,75	0	0,25	0
458.	0,5612	0,5	0,75	1	0,75
459.	0,5623	0,5	0,75	0,5	0
460.	0,5624	0	0,25	0,25	0
461.	0,5624	0,5	0,5	0,75	1
462.	0,5636	0,5	1	0,75	0,75
463.	0,5648	0,75	0,75	1	0,75

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
464.	0,5661	0,5	1	0,25	0,25
465.	0,5662	0,25	0,75	0,75	0
466.	0,5663	0,25	0,75	1	0,5
467.	0,5688	0	1	0,25	1
468.	0,5695	1	0,5	0,75	1
469.	0,5706	0	0,25	0	0,25
470.	0,5710	0,75	1	0,75	0,75
471.	0,5718	0,5	0,5	1	0,25
472.	0,5725	1	0,75	0,5	0,25
473.	0,5732	0,75	0,75	0,75	0,25
474.	0,5750	0,75	0,5	1	0,25
475.	0,5757	0,25	1	0,5	0,75
476.	0,5763	0,5	1	0,5	0,5
477.	0,5765	0,5	0,75	0,75	0,25
478.	0,5778	0,75	0	0	0,25
479.	0,5779	0,25	0,5	1	0
480.	0,5806	0,5	0,75	0,5	1
481.	0,5815	0,75	1	0,5	0,5
482.	0,5822	0,25	1	0,75	0,75
483.	0,5833	0,25	1	0,25	0,25
484.	0,5842	1	0,75	0,75	0,5
485.	0,5847	1	1	0,25	0,5
486.	0,5856	0	0,75	0,75	0
487.	0,5862	0,25	0,5	1	1
488.	0,5874	0,25	0,75	0,75	1
489.	0,5883	1	1	0	0
490.	0,5899	1	0,75	1	0,75
491.	0,5914	0	0,75	0,75	1
492.	0,5916	1	1	0	1
493.	0,5919	0,75	0,75	0,5	0
494.	0,5939	0	0	0,25	0,5
495.	0,5952	1	1	0,5	0,75
496.	0,5959	0	1	0,5	0,25
497.	0,5989	0	0,75	1	0,5
498.	0,5995	0,75	1	0,25	0
499.	0,5997	0	1	1	0,75
500.	0,6003	0	0	0	0,75
501.	0,6021	1	0,5	1	0,25
502.	0,6029	0,75	0,75	0,5	1

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
503.	0,6036	0	1	0,75	0,5
504.	0,6062	0,5	1	0,25	0
505.	0,6070	0,5	0,75	1	0,5
506.	0,6078	0,75	1	0,25	1
507.	0,6102	0,75	0,75	1	0,5
508.	0,6102	0,25	0,75	1	0,25
509.	0,6103	0,5	1	0,75	0,5
510.	0,6107	0,5	1	0,25	1
511.	0,6120	0	0	0,5	0,25
512.	0,6121	0,5	0,5	1	0
513.	0,6130	1	0,75	0,5	0
514.	0,6143	0,75	0,75	0,75	0
515.	0,6153	0,5	0,5	1	1
516.	0,6155	1	0,75	0,5	1
517.	0,6158	1	0	0	0
518.	0,6159	0,75	0,5	1	0
519.	0,6175	0,75	0,5	1	1
520.	0,6176	0,5	0,75	0,75	0
521.	0,6178	0,75	1	0,75	0,5
522.	0,6191	1	1	0,75	0,75
523.	0,6192	0,75	0,75	0,75	1
524.	0,6201	0,25	1	0,25	1
525.	0,6203	0,5	1	0,5	0,25
526.	0,6211	0,5	0,75	0,75	1
527.	0,6219	0,75	1	1	0,75
528.	0,6225	0,25	1	0,5	0,5
529.	0,6240	0,25	1	0,25	0
530.	0,6241	0,5	1	1	0,75
531.	0,6262	0,75	1	0,5	0,25
532.	0,6286	1	1	0,25	0,25
533.	0,6288	1	0,75	0,75	0,25
534.	0,6291	0	1	0,5	1
535.	0,6295	0,25	1	0,75	0,5
536.	0,6309	0,25	1	1	0,75
537.	0,6377	0	1	0,5	0
538.	0,6387	1	0,75	1	0,5
539.	0,6402	1	0,5	1	1
540.	0,6437	1	1	0,5	0,5
541.	0,6442	0	0,75	1	0,25

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
542.	0,6449	1	0,5	1	0
543.	0,6487	0	1	1	0,5
544.	0,6491	0	1	0,75	0,25
545.	0,6498	0,25	0	0,25	0,25
546.	0,6516	0,25	0,75	1	1
547.	0,6533	0,5	1	0,5	1
548.	0,6536	1	1	0,25	1
549.	0,6537	0,5	0,75	1	0,25
550.	0,6542	0,25	0,75	1	0
551.	0,6570	0,5	1	0,75	0,25
552.	0,6573	0,75	0,75	1	0,25
553.	0,6598	1	0,75	0,75	1
554.	0,6600	0,75	1	0,5	1
555.	0,6638	0,25	0	0	0,5
556.	0,6643	0,5	0	0,25	0
557.	0,6643	0,5	1	0,5	0
558.	0,6653	0,75	1	0,75	0,25
559.	0,6676	0	0,75	1	1
560.	0,6693	0,25	1	0,5	0,25
561.	0,6694	1	1	1	0,75
562.	0,6695	1	1	0,75	0,5
563.	0,6708	0,75	1	0,5	0
564.	0,6710	0	1	0,75	1
565.	0,6725	1	1	0,25	0
566.	0,6730	0,75	1	1	0,5
567.	0,6734	1	0,75	0,75	0
568.	0,6739	0,5	0	0	0,25
569.	0,6742	0,25	0	0,5	0
570.	0,6758	0,5	1	1	0,5
571.	0,6768	0,25	1	0,75	0,25
572.	0,6817	0,5	0,75	1	1
573.	0,6822	0,5	1	0,75	1
574.	0,6823	0,25	1	1	0,5
575.	0,6852	0,75	0,75	1	1
576.	0,6874	1	0,75	1	0,25
577.	0,6876	0,25	1	0,5	1
578.	0,6879	0,25	0,25	0	0
579.	0,6894	0	0,75	1	0
580.	0,6907	0,75	1	0,75	1

Lp.	Wartość błędu	M1	M2	M3	M4
581.	0,6921	1	1	0,5	0,25
582.	0,6936	0,25	1	0,75	1
583.	0,6947	0	1	0,75	0
584.	0,6977	0	1	1	0,25
585.	0,6985	0	0	0,75	0
586.	0,7004	0,5	0,75	1	0
587.	0,7035	1	1	0,5	1
588.	0,7037	0,5	1	0,75	0
589.	0,7044	0,75	0,75	1	0
590.	0,7058	1	0,75	1	1
591.	0,7092	0	1	1	1
592.	0,7128	0,75	1	0,75	0
593.	0,7161	0,25	1	0,5	0
594.	0,7199	1	1	0,75	0,25
595.	0,7240	1	1	1	0,5
596.	0,7241	0,25	1	0,75	0
597.	0,7247	0,75	1	1	0,25
598.	0,7254	1	1	0,75	1
599.	0,7275	0,5	1	1	0,25
600.	0,7336	0,25	1	1	0,25
601.	0,7362	1	0,75	1	0
602.	0,7373	0,75	1	1	1
603.	0,7375	0,5	1	1	1
604.	0,7382	0,25	1	1	1
605.	0,7404	1	1	0,5	0
606.	0,7466	0	1	1	0
607.	0,7542	0	0,25	0	0
608.	0,7584	0,75	0	0	0
609.	0,7702	1	1	0,75	0
610.	0,7716	1	1	1	1
611.	0,7765	0,75	1	1	0
612.	0,7785	1	1	1	0,25
613.	0,7792	0,5	1	1	0
614.	0,7850	0,25	1	1	0
615.	0,7932	0	0	0,25	0,25
616.	0,7983	0	0	0,5	0
617.	0,8170	0	0	0	0,5
618.	0,8330	1	1	1	0
619.	0,8384	0,25	0	0,25	0

*L*

---

<b>Lp.</b>	<b>Wartość błędu</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>
<b>620.</b>	0,8643	0,5	0	0	0
<b>621.</b>	0,8681	0,25	0	0	0,25
<b>622.</b>	0,9925	0	0	0,25	0
<b>623.</b>	1,0335	0	0	0	0,25
<b>624.</b>	1,0723	0,25	0	0	0
<b>625.</b>	1,2500	0	0	0	0

# Dorobek naukowy Autorki

## Pełne artykuły

- Kardyńska Małgorzata, Kogut Daria, Pacholczyk Marcin, Śmieja Jarosław: Mathematical modeling of regulatory networks of intracellular processes - aims and selected methods, Computational and Structural Biotechnology Journal, Research Network of Computational and Structural Biotechnology, vol. 21, 2023, s. 1523-1532, DOI:10.1016/j.csbj.2023.02.006 (Wkład Autorki w publikację – 25%)
- Gutowska Kaja, Kogut Daria, Kardyńska Małgorzata, Formanowicz Piotr, Śmieja Jarosław, Puszyński Krzysztof: Petri nets and ODEs as complementary methods for comprehensive analysis on an example of the ATM-p53-NF- $\kappa$ B signaling pathways, Scientific Reports, Nature Publishing Group, vol. 12, nr 1, 2022, Numer artykułu: 1135, s. 1-13, DOI:10.1038/s41598-022-04849-0 (Wkład Autorki w publikację – 25%)
- Kałużynski Piotr, Opilski Zbigniew, Niedzielska I., Sitek-Ignac N., Kogut Daria: Luminescence spectroscopy measurements for skin cancer research, Photonics Letters of Poland, Polskie Stowarzyszenie Foniczne, vol. 10, nr 1, 2018, s. 5-7, DOI:10.4302/plp.v10i1.803 (Wkład Autorki w publikację – 5%)

## Rozdziały w monografiach

- Kogut Daria, Śmieja Jarosław, Kocikowska Olga, Lalik Anna: Matematyczny model translacji oparty na maszynach stanowych, W: Automatyzacja procesów dyskretnych. Teoria i zastosowania. T. 2 / Świerniak Andrzej, Krystek Jolanta (red.), 2022, Politechnika Śląska, ISBN 978-83-7880-855-8, s. 65-72

- Kogut Daria, Gutowska K., Poterała-Hejmo Aleksandra, Śmieja Jarosław, Formanowicz D., Formanowicz P.: Petri nets and ODE as complementary tools in analysis of signaling pathways, W: Proceedings of 11th International Conference on Bioinformatics and Computational Biology : Eds.: Oliver Eulenstein, Hisham Al-Mubaid and Qin Ding / Eulenstein O., Al-Mubaid H., Ding Q. (red.), EPiC Series in Computing, vol. 60, 2019, EasyChair, s. 150-160, DOI:10.29007/542h
- Kogut Daria, Śmieja Jarosław: Modelowanie produkcji białek w komórkach jako systemu masowej obsługi ze sterowaniem, W: Automatyzacja procesów dyskretnych : Teoria i zastosowania / Świerniak Andrzej, Krystek Jolanta (red.), 2018, Politechnika Śląska, ISBN 978-83-7880-566-3, s. 111-118
- Kałużński Piotr, Kogut Daria: Luminescence spectroscopy diagnosis system for skin cancer research: k-Nearest Neighbour method classifier, W: 13th Conference on Integrated Optics: Sensors, Sensing Structures, and Methods / Struk Przemysław, Pustelny Tadeusz (red.), Proceedings of SPIE: Photonics Applications in Astronomy, Communications, Industry, and High-Energy Physics Experiments, vol. 10830, 2018, SPIE - The International Society for Optics and Photonics, ISBN 978-1-5106-2272-2, paper 108300X 1-5, DOI:10.1117/12.2503690
- Kogut Daria, Hudy Dorota, Śmieja Jarosław: A simple mathematical model of ribosome profile, W: Proceedings of the twenty third National Conference on Applications of Mathematics in Biology and Medicine, Jugowice, 11-15 September 2017 / Foryś U., Śmieja J. (red.), 2017, Politechnika Śląska, ISBN 978-83-932893-3-2, s. 95-99,

### **Udział w konferencjach naukowych – postery oraz referaty**

- Kocikowska Olga, Kogut Daria, Lalik Anna: The effect of normalization techniques - comparison of methods on the example of Western Blot analysis for HeLa cells, W: XXVI Gliwice Scientific Meetings, Gliwice, November 18-19, 2022, Numer artykułu: P35, 2022, s. 99
- Kogut Daria, Kałużński Piotr, Skonieczna Magdalena, Ślęzak-Prochazka Izabella, Kazek-Kęsik Alicja: A novel non-pathogenic method for analyzing the virus filtering ability of protective masks using the fluorescence phenomenon, W: 25th

---

Anniversary of Gliwice Scientific Meetings : Joint online seminar of the Polish Proteomics Society and the Finnish Proteomics Society: Proteomics of Extracellular Vesicles. [on-line], November 18-20, 2021, 2021, [b.w.], (plik pdf) 69

- Kogut Daria, Kocikowska Olga, Lalik Anna: Polysome association of PTEN mRNA in control and irradiated HCT 116 cell line, W: XXIV Gliwice Scientific Meetings 2020, Gliwice, November 20-21, 2020 [online], 2020, [b.w.], (plik pdf) 131
- Kogut Daria, Lalik Anna: Wpływ metody analizy wyników QPCR na rozkład wybranego transkryptu we frakcjach polisomalnych, W: VII Śląskie Spotkania Naukowe, Gliwice, 29-30 maja 2020 r, 2020, [b.w.], s. 40
- Gutowska K., Kogut Daria, Kardyńska Małgorzata, Formanowicz P., Puszyński Krzysztof: Petri nets vs ode - competition or cooperation? : Systems approach to modeling and analysis of the crosstalk between ATM, P53, and NF-KB, W: 23rd Gliwice Scientific Meetings 2019, Gliwice, November 22-23, 2019, 2019, [b.w.], s. 102
- Kogut Daria, Śmieja Jarosław, Hudy Dorota: Mathematical model of translation described as a Markov Process, based on polysomal profile, W: XII Symposium of Polish Bioinformatics Society, Kraków, September 19-21, 2019 : Book of abstracts, 2019, [b.w.], s. 83
- Kałużyński Piotr, Opilski Zbigniew, Kogut Daria, Niedzielska I., Sitek-Ignac N.: Luminescence spectroscopy diagnosis system for non-invasive in vivo skin cancer research, W: Integrated optics - sensors, sensing structures and methods: IOS'2018, 26th February to 2nd March 2018, Szczyrk - Beskidy Mountains, Poland. Programme and abstracts, 2018, [b.w.], s. 107
- Kałużyński Piotr, Kogut Daria: System diagnostyczny oparty na spektroskopii luminescencyjnej jako nieinwazyjny system in vivo detekcji zmian nowotworowych, W: V Śląskie Spotkania Naukowe, Bobolice, 25-26 Maja 2018 r, 2018, [b.w.], s. 18
- Kogut Daria, Śmieja Jarosław: Translation modeling as a Markov process, W: XXIIInd Gliwice Scientific Meetings 2018, Gliwice, November 16-17, 2018, 2018, [b.w.], s. 131



- Kałużyński Piotr, Kogut Daria: Non-invasive in vivo luminescence spectroscopy diagnosis system for skin cancer research, W: XXIst Gliwice Scientific Meetings 2017, Gliwice, November 17-18, 2017, 2017, [b.w.], s. 102
- Kogut Daria, Śmieja Jarosław: Modeling miRNA-mediated translation control, q-bio conference, 26-29.06.2018 Houston, USA

### **Wyjazdy naukowe**

- Q-bio Summer School, Houston, USA, 10-25.06.2018
- InformationTransmission in Biological Systems, Będlewo, 05-09.03.2018

### **Udzielone patenty**

- Ślęzak-Prochazka Izabella, Skonieczna Magdalena, Kogut Daria, Kazek-Kęsik Alicja, Kałużyński Piotr, Wynalazek, Chroniony, Numer zgłoszenia (w pierwszym kraju zgłoszenia powyżej): 438770, Numer patentu/prawa: 240953, Data zgłoszenia (w pierwszym kraju zgłoszenia powyżej): 19-08-2021, Data udzielenia prawa: 20-05-2022, Publikacja patentu/wzoru: [WUP 04-07-2022], tytuł: **Sposób badania zdolności filtracyjnych materiałów masek ochronnych**

### **Udział w projektach**

- OPUS, NCN (UMO-2015/19/B/ST7/02984), Kierownik: prof. dr hab. inż. Marek Kimmel. Tytuł projektu: Modeling and experimental studies to understand the effects of irradiation on RNA interference. Rola – stypendysta-doktorant
- OPUS, NCN (2021/41/B/NZ2/04134), Kierownik: prof. dr hab. inż. Marek Kimmel. Tytuł projektu: Evolutionary genomics: Modeling and prediction of progression of breast and lung cancer. Rola – stypendysta-doktorant
- SZAFIR, NCBiR (DOB-SZAFIR/02/B/004/02/2021), Tytuł projektu: Opracowanie funkcjonalnych bioaktywnych ochron tekstylnych do zabezpieczenia medycznego Sił Zbrojnych RP jako elementu przeciwdziałania zakażeniom SARS-COV-2. Rola – Wykonawca, ocena biokompatybilności

- Grant projakościowy rektorski, Kierownik projektu: Izabella Ślęzak-Prochazka.  
Tytuł projektu: Ocena przepuszczalności obecnie stosowanych oraz nowych materiałów dla medycznych masek ochronnych pod kątem zapobiegania rozprzestrzeniania się wirusów i bakterii
- Grant projakościowy (02/040/SDU/10-22-02), Temat projektu: Poszukiwanie molekularnego mechanizmu przełączania ekspresji izoform białka p53 w komórkach nowotworowych. Kierownik projektu - mgr inż. Daria Kogut (Kałużyńska)