

Daria KOGUT, Jarosław ŚMIEJA
Politechnika Śląska

MODELOWANIE PRODUKCJI BIAŁEK W KOMÓRKACH JAKO SYSTEMU MASOWEJ OBSŁUGI ZE STEROWANIEM

Streszczenie. Białka są produkowane w żywych komórkach podczas translacji mRNA, w której elementami wykonawczymi są rybosomy. Ponieważ do jednej nici mRNA może być przyłączone wiele rybosomów, szybkość powstawania nowych cząsteczek zależy m.in. od ich liczby. Proces ten podlega wielu mechanizmom regulacyjnym, wśród których ważną rolę odgrywają cząsteczki mikroRNA (miRNA), które w odpowiednim kompleksie przyłączają się do mRNA, co w konsekwencji prowadzi do zahamowania produkcji białek. Niniejsza praca prezentuje nowe podejście do modelowania procesu translacji, oparte na spojrzeniu nań z punktu widzenia systemów masowej obsługi. Stanowiskiem obsługi jest pojedyncza nić mRNA, a klientami rybosomy, które przyłączają się do niej. Liczba stanowisk masowej obsługi może ulegać zmianie na skutek oddziaływań miRNA, a w szerszym kontekście również na skutek produkcji i, niezależnej od miRNA, degradacji mRNA. Zakończenie obsługi pojedynczego klienta jest równoważne wyprodukowaniu jednej cząsteczki białka. Model został zaimplementowany w postaci automatu komórkowego, aby umożliwić uwzględnienie biologicznych mechanizmów kontroli, zachodzących w trakcie translacji. Proponowany model powinien ułatwić badania nad mechanizmami regulacji tego procesu.

CELLULAR AUTOMATA DESCRIBED BY THE QUEUE SYSTEM AS AN ALTERNATIVE METHOD IN MODELING OF REGULATION OF TRANSLATION PROCESS

Summary. Proteins are produced in living cells in the mRNA translation process, executed by ribosomes. As multiple ribosomes may be bound to mRNA simultaneously, the rate of production depends on their number. The process is regulated by many mechanisms, among which those employing microRNA (miRNA) play an important role. Through binding to mRNA in a particular complex, miRNA stops the protein production. This work presents a novel framework to model the translation process, in which it is viewed from a queuing systems perspective. The ribosomes are clients entering the system, to be serviced by mRNA. The number of the service stations may be controlled through interactions with miRNA and, in a wider model, also through production and miRNA-independent degradation of mRNA. Successful completion of one

service event is equivalent to production of one protein molecule. The model has been implemented in the form of a cellular automaton, to allow for incorporating various biological mechanisms. It should facilitate further research on the mechanisms of regulation of the translation process.

1. Wstęp

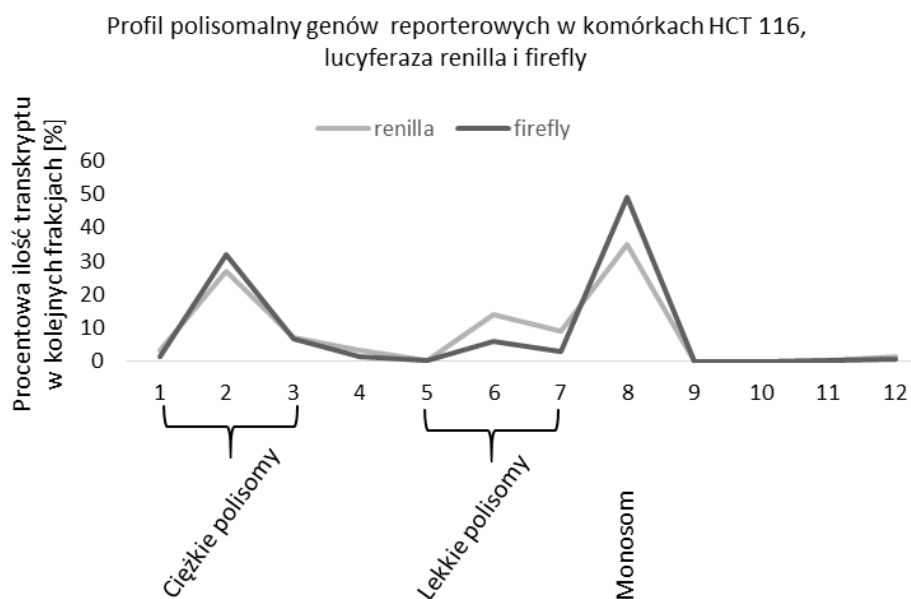
Procesy biochemiczne, zachodzące wewnątrz żywych komórek, podlegają złożonym mechanizmom regulacyjnym. Ich poznanie z jednej strony prowadzi do zrozumienia molekularnych podstaw wielu procesów chorobowych, a z drugiej, umożliwia poszukiwanie sposobów oddziaływania na komórki w celu uzyskania pożądaných efektów. Z tego względu coraz więcej grup badawczych zajmuje się stosunkowo nową dziedziną, jaką jest biologia obliczeniowa, tworząc i analizując modele procesów wewnątrzkomórkowych. Niniejsza praca skupia się wyłącznie na jednym z nich – translacji, oraz na jednym z mechanizmów regulacyjnych, opartych na działaniu cząsteczek mikroRNA. Ze względu na podobieństwo do technologicznych procesów produkcyjnych, zarówno z punktu widzenia zdarzeń, które zachodzą w dyskretnych chwilach czasu, oraz wielu, równoległe zachodzących etapów produkcji, w pracy zaproponowano spojrzenie na przedmiot badań jako na system (a właściwie równoległe systemy) masowej obsługi. Powinno to umożliwić wykorzystanie bogatej teorii systemów kolejkowych do analizy procesów biologicznych w sposób, jaki do tej pory nie był wykorzystywany.

2. Podstawy biologiczne

Proces translacji (nazywany też biosyntezą białek) jest ostatnim z trzech etapów syntezy białek. Translacja obejmuje trzy etapy: inicjację, elongację i terminację [2]. Pierwszy etap translacji rozpoczyna się w momencie przyłączenia się mniejszej podjednostki rybosomu do matrycowego RNA (mRNA), powstałego w procesie transkrypcji. Translacja rozpoczyna się w momencie utworzenia kompleksu mRNA-rybosom. Następnie do mniejszej podjednostki przyłączają się białka inicjujące (ang. *Initiation Factor Proteins*). Rybosom przesuwa się po nici mRNA do momentu napotkania kodonu rozpoczynającego tłumaczenie nici (najczęściej jest to metionina). Następnie dołączany jest antykonon (trójka nukleotydów o sekwencji komplementarnej do danego aminokwasu), a nić mRNA przesuwa się, robiąc miejsce dla kolejnego antykononu. Translacja trwa tak długo, dopóki nie zostanie rozpoznany tzw. kodon STOP (kodon o sekwencji UAA, UAG lub UGA). Kodony te są rozpoznawane przez specjalne białka uwalniające (ang. *Release factors*), które wiążą się z kodonami STOP i uwalniają mRNA oraz łańcuch polipeptydowy do cytoplazmy. Ten etap nazywany jest terminacją [10].

Transkrypt (mRNA) może przeprowadzić translację wiele razy i przez kilka rybosomów równoległe. W przypadku przyłączeniu się więcej niż jednego rybosomu do matrycy, mówi się o powstaniu tzw. frakcji polisomalnych [6, 7]. Dużą zaletą występowania frakcji polisomalnych jest zwiększenie wydajności procesu translacji. Eksperymenty laboratoryjne wykazują jednak, że to nie polisomy, a monosomy są najczęściej występującymi frakcjami (rys. 1). Wydaje się, że skłonność matrycy

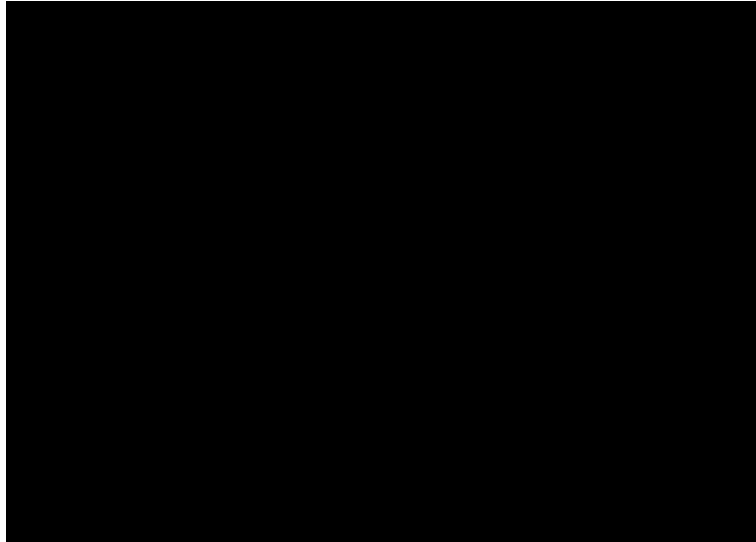
mRNA do przyłączania większej liczny rybosomów może w dużej mierze zależeć od stanu komórki (narażenie na stres, obecność związków blokujących przyłączenie rybosomów do matrycy itp.).



Rys. 1. Procent występowania poszczególnych frakcji polisomalnych dla białek reporterowych – Renilli i Firefly w komórkach HCT116. Etykiety na osi poziomej odpowiadają numerom kolejnych frakcji [8]

Proces translacji oraz profil rybosomalny można regulować na wiele sposobów, m.in. za pomocą związków chemicznych, które mogą zahamować translację wszystkich białek, bądź mogą być skierowane przeciwko konkretnemu białku. Innym sposobem jest regulacja ekspresji za pomocą miRNA – krótkich (o długości 19 - 23 nukleotydów), niekodujących, pojedynczych nici RNA, które, poprzez przyłączenie się do mRNA, blokują możliwość przyłączania się rybosomów, bądź doprowadzają do degradacji [5]. W procesie biogenezy, miRNA tworzy dupleks z drugą nicią miRNA. Jedna z nici jest nicią „aktywną”, czyli czynnie biorącą udział w hamowaniu bądź degradacji mRNA, druga nie bierze udziału w wyciszaniu genów. miRNA jest zdolne do wyciszania genów w momencie przyłączenia się aktywnej nici do kompleksu RISC. Aktywna forma RISC-miRNA zostaje skierowana do homologicznej sekwencji mRNA. Po połączeniu mRNA z miRNA, białko Ago-2 (białko z rodziny Agronaut) rozcina mRNA w ściśle określonym miejscu (każdy kompleks ma właściwość cięcia tylko w jednym miejscu, najczęściej jest to między 10 a 11 nukleotydem w dupleksie miRNA/mRNA) [1,4]. Po rozcięciu mRNA przez RISC, sekwencja nukleotydów zostaje pozbawiona łańcucha poli-A przy końcu 3' oraz czapeczki 7- metyloguaninowej, przez co łańcuch przestaje być chroniony i dochodzi do strawienia łańcucha przez RNA-zy [9, 11].

Blokowanie translacji przez miRNA zachodzi w momencie, gdy nie występuje całkowita komplementarność pomiędzy miRNA a mRNA przy końcu 3', natomiast do całkowitej degradacji nici dochodzi w sytuacji, w której miRNA jest całkowicie komplementarna (rys. 2) [5].



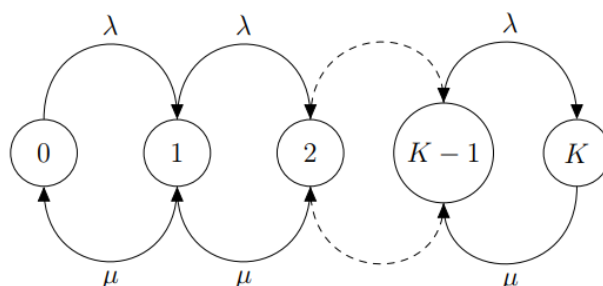
Rys. 2. Schemat alternatywnych ścieżek hamujących produkcję białek przez miRNA

3. Model translacji jako procesu obsługi w systemie kolejkowym

Jak wspomniano we Wstępie, w niniejszej pracy proponujemy wykorzystanie teorii systemów masowej obsługi do modelowania procesu translacji. Naturalnym wydawałoby się przedstawienie rybosomu jako pojedynczego stanowiska obsługi, ponieważ w układzie biologicznym jest on jednostką wykonawczą. Jednak ze względu na możliwość równoległej translacji, zachodzącej na pojedynczej nici RNA z wykorzystaniem wielu rybosomów jednocześnie, należy odwrócić tę reprezentację. Klientem w systemie jest rybosom, a nić RNA – stanowiskiem obsługi (może również reprezentować pojedynczą linię produkcyjną, na której równolegle montowane są kolejne aminokwasy, prowadząc do powstania białka).

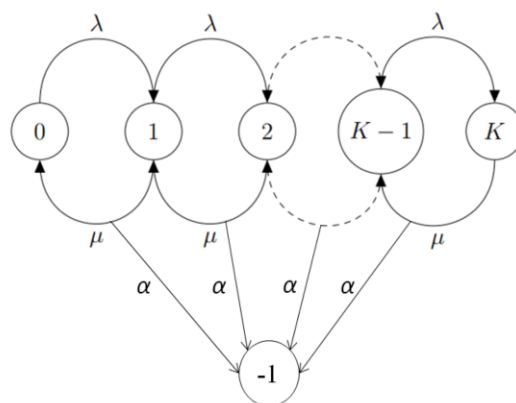
Zakłada się, że źródło klientów jest nieograniczone, ponieważ w komórce jest wiele rybosomów i nie stanowią one wielkości ograniczającej tempo translacji (z doświadczeń biologicznych wynika, że można pominąć współzawodniczenie nici mRNA o rybosomy). Czas nadejścia kolejnego klienta (przyłączenie się rybosomu do mRNA) opisany jest rozkładem wykładniczym, przy czym w najprostszym modelu można założyć, że parametr tego rozkładu jest stały, a w bardziej zaawansowanych uwzględnić fakt, że skłonność przyłączenia kolejnego rybosomu może zależeć od liczby już przyłączonych (czyli liczby klientów w kolejce do danego stanowiska obsługi). Czas obsługi jest zmienną losową, również opisaną rozkładem wykładniczym. Podobnie, jak w przypadku nadejścia kolejnych klientów do systemu, można uzależnić parametr tego rozkładu od liczby przyłączonych rybosomów (zakładając, że większa liczba rybosomów w kolejce utrudnia obsługę na skutek większej liczby chwilowych zatrzymań ruchu pojedynczego rybosomu wzdłuż nici mRNA lub wręcz przeciwnie – że większa liczba rybosomów ułatwia translację poprzez zmianę konformacyjną struktury 3D nici mRNA). Dodatkowo, parametr ten można uzależnić od składu nukleotydów. Liczba klientów w systemie jest ograniczona i uzależniona od długości mRNA. Zakłada się, że pojedynczy rybosom zajmuje miejsce na długości 180 zasad, a minimalna odległość pomiędzy dwoma sąsiednimi rybosomami nie może być mniejsza niż 40 zasad.

Podstawowy schemat dla pojedynczego stanowiska obsługi bez sterowania został przedstawiony na rysunku 3. Numer stanu oznacza liczbę klientów w kolejce, czyli liczbę rybosomów przyłączonych do pojedynczej nici mRNA. Przejście do stanu o wyższym numerze związane jest z przyłączeniem kolejnego rybosomu, natomiast przejście do stanu o niższym numerze z zakończeniem procesu translacji przez rybosom, znajdujący się na końcu nici i odłączenie się rybosomu. Zakłada się, że prawdopodobieństwo przerwania translacji na skutek innego zdarzenia jest pomijalnie małe.



Rys. 3. Schemat pojedynczego stanowiska bez sterowania

Przyłączenie się kompleksu z miRNA do nici mRNA powoduje zatrzymanie procesu translacji. W przypadku rozpatrywanym w niniejszej pracy jest to proces nieodwracalny, co wynika ze skierowania tej nici do degradacji. W związku z tym, do podstawowego modelu należy dodać stan pochłaniający, reprezentujący sytuację, w której, niezależnie od liczby dotychczas przyłączonych rybosomów, przyłącza się kompleks z miRNA (rys. 4). Prawdopodobieństwo takiego przyłączenia zależy od stężenia miRNA, które jest zmienną sterującą w procesie.



Rys. 4. Schemat pojedynczego stanowiska ze sterowaniem

Dynamika rozpatrywanego układu może być opisana w standardowy sposób [3], za pomocą następującego układu równań różniczkowych. Dla nici mRNA o numerze j mamy:

$$\begin{aligned}
\dot{P}_{0j} &= \mu_1 P_{1j} - (\lambda_0 + \alpha) P_{0j} \\
\dot{P}_{1j} &= -(\lambda_1 + \alpha + \mu_1) P_{1j} + \lambda_0 P_{0j} + \mu_2 P_{2j} \\
&\vdots \\
\dot{P}_{kj} &= -(\lambda_k + \alpha + \mu_k) P_{kj} + \lambda_{k-1} P_{k-1j} + \mu_{k+1} P_{k+1j}, \quad k < K - 1 \\
&\vdots \\
\dot{P}_{Kj} &= -(\alpha + \mu_K) P_{Kj} + \lambda_{K-1} P_{K-1j}
\end{aligned} \tag{1}$$

gdzie P_{kj} oznacza prawdopodobieństwo wystąpienia k klientów w kolejce na j -tym stanowisku obsługi.

W systemie istnieje wiele stanowisk obsługi. Ich początkowa liczba jest parametrem modelu – można, zmieniając go, analizować np. wariancję liczby powstających białek przy małej, średniej i dużej liczbie mRNA. Najprostsze sterowanie systemem, rozpatrywane w niniejszej pracy, polega na sterowaniu ich liczbą za pomocą miRNA, które, losowo przyłączając się do mRNA, powoduje wyłączenie stanowiska obsługi. Można przy tym uwzględnić specyficzność oddziaływań miRNA-mRNA poprzez zwiększenie prawdopodobieństwa takiego przyłączenia w przypadku większej specyficzności/powinowactwa miRNA do danego mRNA i większej ilości miRNA.

Zakładając niezależność przyłączania się rybosomów oraz miRNA do oddzielnych nici RNA, każdą z nici (czyli każde stanowisko obsługi) można opisywać w ten sam sposób, za pomocą układu (1). Zsumowanie dla każdego stanowiska j i każdego k prawdopodobieństw P_{kj} odpowiada wyznaczeniu frakcji polisomalnych, obserwowanych eksperymentalnie:

$$f_k = \sum_{j=1}^N P_{kj}, \tag{2}$$

przy czym f_0 odpowiada frakcji bez rybosomu, f_1 – frakcji monosomalnej, natomiast frakcje z lekkimi i ciężkimi polisomami należy rozdzielić na podstawie arbitralnie przyjętego progu wartości $k > 1$.

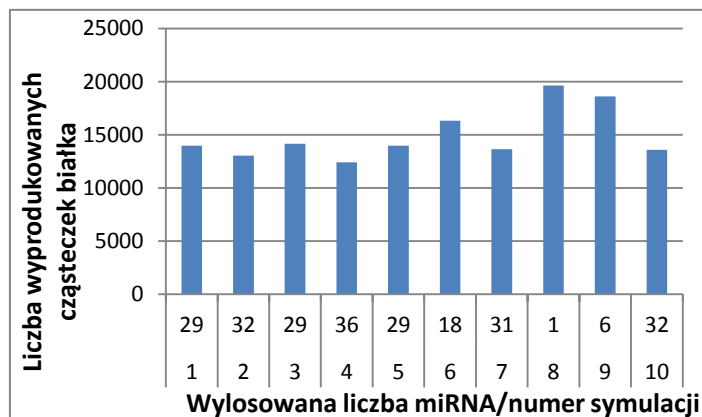
4. Automat komórkowy

Opisany w poprzedniej sekcji system masowej obsługi został zaimplementowany w postaci automatu komórkowego [12] dla każdej nici mRNA. Stan automatu odpowiada liczbie klientów w systemie (liczbie przyłączonych rybosomów), przy czym dodatkowy stan reprezentuje przyłączenie się regulatorowej cząsteczki miRNA. Dla każdego stanu zapamiętywane jest położenie poszczególnych rybosomów. Pojedyncza iteracja odpowiada jednej sekundzie, w trakcie której poszczególne rybosomy mogą przesunąć się o 5 kodonów lub zatrzymać się. Na początku każdej iteracji następuje sprawdzenie wystąpienia zdarzenia przyłączenia się cząsteczki miRNA do nici. Jeśli wystąpiło, nic jest usuwana z systemu. W przeciwnym wypadku losowane jest zdarzenie przesunięcia/zatrzymania dla każdego rybosomu z osobna, rozpoczynając od znajdującego się najdalej na nici. Kolejne rybosomy mogą się przesunąć pod warunkiem zachowania minimalnej odległości od następnego. Nowy rybosom może przyłączyć się do nici pod warunkiem, że jej początek nie jest zajęty

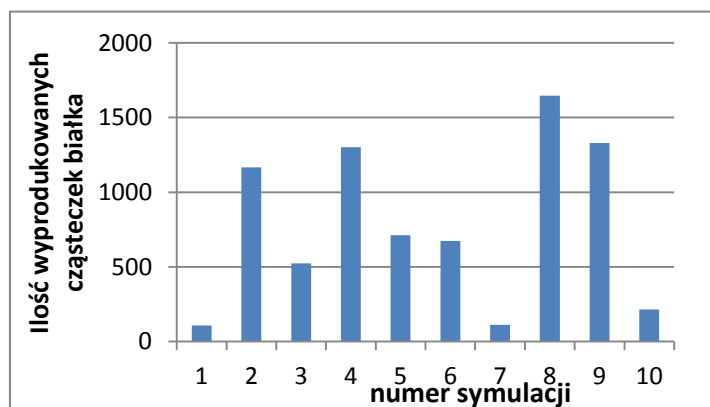
przez inny poprzednio przyłączony. Po dojściu ostatniego rybosomu do końca nici jest on odłączany, a liczba wyprodukowanych białek zwiększa się o 1.

5. Przykładowe wyniki numeryczne

Dla sprawdzenia wpływu ilości miRNA na produkcję białka przeprowadzono symulacje dla dwóch przypadków: losowej, ale stałej w trakcie symulacji (rys. 5) oraz losowej, zmiennej w czasie (rys. 6) liczby cząsteczek miRNA. Każda symulacja reprezentowała translację zachodzącą z jednej cząsteczki mRNA w ciągu jednej godziny.



Rys. 5. Liczba wyprodukowanych cząsteczek białka dla stałej liczby miRNA, losowanej w zakresie od 0-100 w każdym powtórzeniu



Rys 6. Liczba wyprodukowanych cząsteczek białka w obecności miRNA, dla dziesięciu powtórzeń. Liczbę mRNA losowano co 5 minut z zakresu 0-100 cząsteczek

Jak widać, nawet w przypadku stałego poziomu miRNA, można otrzymać znaczne zróżnicowanie ilości wyprodukowanego białka (rys. 5), a w konsekwencji utratę korelacji z dynamiką zmian mRNA, przy czym nie jest to skorelowane z liczbą cząsteczek miRNA. W przypadku losowego, zmiennego w czasie poziomu miRNA, poziom zróżnicowania jest jeszcze większy (rys. 6).

6. Podsumowanie

Zaproponowany w pracy sposób modelowania procesu translacji umożliwia uwzględnienie nie tylko sterowania tym procesem poprzez oddziaływanie miRNA-mRNA, ale również, poprzez zastosowanie automatu komórkowego, dodatkowych zjawisk, takich jak np. chwilowe zatrzymanie procesu translacji. Zmiana reguł automatu komórkowego (wprowadzenie możliwości odłączenia się miRNA) umożliwia rozróżnienie dwóch różnych mechanizmów uruchamianych przez miRNA – degradacji mRNA i odwracalnej inhibicji translacji. Pozwala również na porównanie wyników symulacji z wynikami eksperymentalnymi, zarówno na poziomie frakcji polisomalnych, jak i ilości wyprodukowanego białka oraz ilości mRNA. Jest on podstawą do prowadzenia dalszych badań opartych na polisomach oraz regulacji ekspresji genów.

*Praca była częściowo finansowana ze środków z grantu NCN
grant DEC 2015/19/B/ST7/02984*

LITERATURA

1. Bartel D.P.: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004; 116,p. 281-297.
2. Clancy S., Brown W.: Translation: DNA to mRNA to protein. *Nature Education*, 1(1):101.
3. Czachórski T. Modele kolejkowe systemów komputerowych. Wydawnictwo Politechniki Śląskiej, Gliwice 1999.
4. Doench J.G., Petersen C.P., Sharp P.A.: siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.*, 2003; 17, p. 438-442.
5. Filip A. MikroRNA: nowe mechanizmy regulacji ekspresji genów. *Postępy Biochemii* 53 (4) 2007, p. 413-419.
6. Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS.: Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*. 2011 Nov 11 147(4):789-802 doi: 10.1016/j.cell.2011.10.002. p.793.
7. J.R.Warner, A. Rich, C.E. Hall: Electron Microscope Studies of Ribosomal Clusters Synthesizing Hemoglobin, *Science* 1962; 138(3542), p. 1399-1403.
8. Kogut D. et al.: A simple mathematical model of ribosome profile. *Proceedings of the XXIII National Conference on Applications of Mathematics in Biology and Medicine*, 2017, p. 96-99.
9. Lage H.: Potential applications of RNA interference technology in the treatment of cancer., *Future Oncol.* 2005 Feb;1(1), p. 103-13.
10. Marintchev A., Wagner G.: Translation initiation: structures, mechanism and evolution., *Quarterly Reviews of Biophysics* 37, 197–284, 3/4, 2004.
11. Ramakrishnan V.: Ribosome structure and mechanism of translation., *Cell*, Vol 108, 557-572, February 22, 2002.
12. Schiff J.L.: *Cellular Automata: A Discrete View of the World*, John Wiley & Sons, 2011.