

Daria KOGUT, Jarosław ŚMIEJA, Olga KOCIKOWSKA, Anna LALIK  
Politechnika Śląska

## MATEMATYCZNY MODEL TRANSLACJI OPARTY NA MASZYNACH STANOWYCH

**Streszczenie.** Translacja jest jednym z kluczowych procesów komórkowych i jest wrażliwa na zmiany środowiska. Poznanie mechanizmów regulacji translacji jest istotne dla zrozumienia zmian zachodzących w komórce zarówno w stanach patologicznych jak i podczas prawidłowego cyklu komórkowego. W niniejszej pracy prezentujemy model translacji oparty na maszynach stanowych uwzględniający wpływ czynników wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych na szybkość translacji.

## MATHEMATICAL MODEL OF PROTEIN TRANSLATION BASED ON STATE MACHINES

**Summary.** Translation is one of the key processes and is sensitive to environmental changes. Understanding the mechanisms of translation regulation is important for expanding the knowledge of the changes taking place in the cell both in pathological states and during the normal cell cycle. In this paper, we present a state machine-based translation model that considers the influence of intra- and extracellular factors on translation efficiency.

### 1. Wprowadzenie

Translacja to proces syntezy białka na matrycy mRNA, w którym kluczową rolę odgrywają rybosomy. Rybosomy są to kompleksy białek i cząsteczek rRNA (rybosomalne RNA), w których można wyróżnić dużą i małą podjednostkę [10]. Proces translacji rozpoczyna się po napotkaniu przez kompleks inicjujący, obejmujący małą podjednostkę rybosomu, kodonu START (u eukariota jest to sekwencja AUG znajdująca się na 5'-końcu cząsteczki mRNA), co umożliwia przyłączenie się do tego kompleksu dużej podjednostki rybosomu i powstanie rybosomu aktywnego translacyjnie. Podczas syntezy białka rybosom przesuwa się wzdłuż cząsteczki mRNA ulegającej translacji, a każdy krok obejmuje: (1) dekodowanie mRNA za pomocą tRNA (transportujące RNA), (2) tworzenie wiązania peptydowego między końcem syntezywanego łańcucha białkowego a aminokwasem transportowanym przez tRNA komplementarny do sekwencji kodonu znajdującego się na mRNA oraz (3) translację kompleksu mRNA-tRNA [14]. Rybosom przemieszcza się wzdłuż cząsteczki mRNA do momentu napotkania kodonu STOP (sekwencja UAA, UAG lub UGA), kiedy to następuje oddysocjowanie rybosomu

od cząsteczki mRNA i uwolnienie nowopowstałego łańcucha białkowego [8]. Translacja cząsteczki mRNA może przebiegać w sposób równoległy, tzn. do jednej cząsteczki mRNA może być równocześnie przyłączonych więcej rybosomów niż jeden. Kompleks mRNA z rybosomami to monosom (cząsteczka mRNA związana jest z jednym rybosomem) lub polisom (do cząsteczki mRNA przyłączony jest więcej niż jeden rybosom). Liczba rybosomów przyłączonych do mRNA dostarcza informacji o statusie translacyjnym danego mRNA: wolne mRNA i mRNA związane z małą podjednostką rybosomu to mRNA nieaktywne translacyjnie; cząsteczki mRNA związane z kilkoma rybosomami (tzw. lekkie polisomy) ulegają słabej translacji; cząsteczki mRNA związane z dużą liczbą rybosomów (tzw. ciężkie polisomy) to cząsteczki mRNA intensywnie syntezujące białka [13]. Szybkość translacji jest dominującym czynnikiem kontrolującym poziom białka w komórce [15] i jest wrażliwa zarówno na czynniki zewnątrzkomórkowe (np. hormony, promieniowanie) jak i czynniki wewnątrzkomórkowe (np. dostępność aminokwasów) [6]. Szczególnie interesującymi cząsteczkami wiążącymi się z mRNA są cząsteczki miRNA: stwierdzono, że występują w formie związanej z aktywnie syntezowanym mRNA [11], ale mechanizm regulacji translacji przez miRNA jest jeszcze słabo poznany.

Chcąc lepiej zrozumieć regulację translacji poprzez miRNA oraz móc przewidzieć zmianę szybkości translacji konkretnych mRNA w odpowiedzi na stres oksydacyjny (indukowany np. przez promieniowanie jonizujące), w oparciu o dane eksperymentalne, opracowano model matematyczny translacji oparty na maszynach stanowych. Model uwzględnia profil polisomalny (rozkład frakcji zawierających wolne mRNA, monosomy i polisomy) badanego mRNA oraz wpływ promieniowania jonizującego i miRNA na proces syntezy białka.

## 2. Eksperymentalne wyznaczenie parametrów modelu

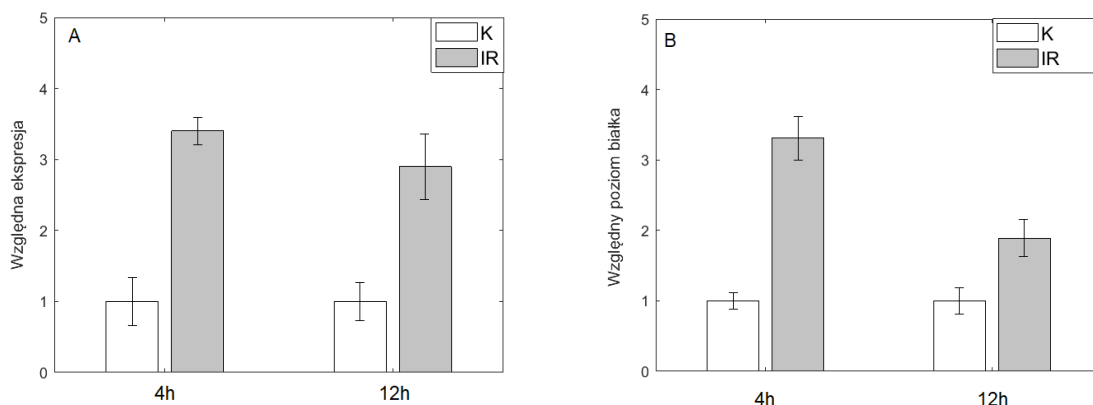
### 2.1. Metodyka

Badania prowadzono na komórkach raka jelita grubego HCT116 hodowanych w warunkach standardowych. W celu zbadania wpływu promieniowania jonizującego na translację komórki napromieniowano dawką 4Gy i zbierano próbki 4 h i 12 h po napromieniowaniu. Kontrolę stanowiły komórki nietraktowane promieniowaniem. Transkryptem testowym było mRNA kodujące białko Bax oraz miRNA-762.

Poziom ekspresji Bax/miRNA-762 oznaczano dwuetapową metodą RT-qPCR, używając jako matrycy totalnego RNA wyizolowanego z osadów komórkowych. Poziom białka Bax w komórkach oznaczano metodą Western Blot. Profil polisomalny wyznaczano metodą wirowania w gradiencie sacharozy zgodnie z protokołem [4]. Po wirowaniu wyodrębniono cztery frakcje: wolne RNA, monosomy, lekkie polisomy i ciężkie polisomy. Profil polisomalny wyznaczono na podstawie ilości mRNA<sub>Bax/miRNA-762</sub> znajdującego się w każdej frakcji. Wyniki przedstawiono jako udział procentowy każdej frakcji w obrębie badanego transkryptu zgodnie z [13].

## 2.2. Wyniki

Poziom ekspresji aktywowanego promieniowaniem jonizującym białka Bax [12] oznaczono w komórkach HCT116, zarówno kontrolnych jak i w komórkach napromieniowanych, na poziomie transkrypty i na poziomie białka. Wyniki przedstawiono na rysunku 1. Dodatkowo oznaczono poziom ekspresji miR-762 (rys. 2), które to miRNA bierze udział w regulacji apoptozy i może regulować ekspresję białka Bax [9]. Ponieważ model uwzględnia profil polisomalny badanego mRNA, oznaczono profil polisomalny zarówno dla mRNA kodującego Bax (mRNA\_Bax) jak i dla miR-762 (rys. 3).

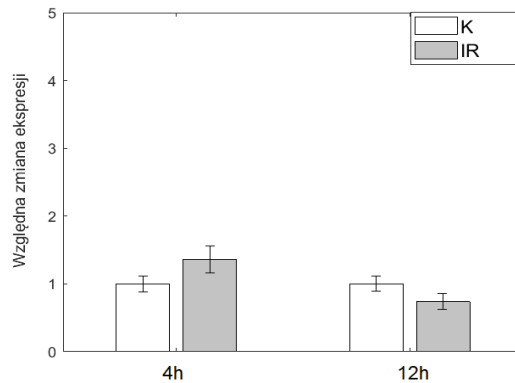


Rys. 1. Poziom ekspresji Bax w komórkach HCT 116 traktowanych promieniowaniem jonizującym. Ekspresję Bax oznaczono na poziomie transkrypty (A) i na poziomie białka (B). Na wykresach przedstawiono względny poziom Bax w komórkach kontrolnych i napromieniowanych, znormalizowany do kontroli. 4 h, 12 h – czas inkubacji komórek po napromienieniu. Wyniki są średnią z pomiarów z zaznaczonym odchyleniem standardowym.

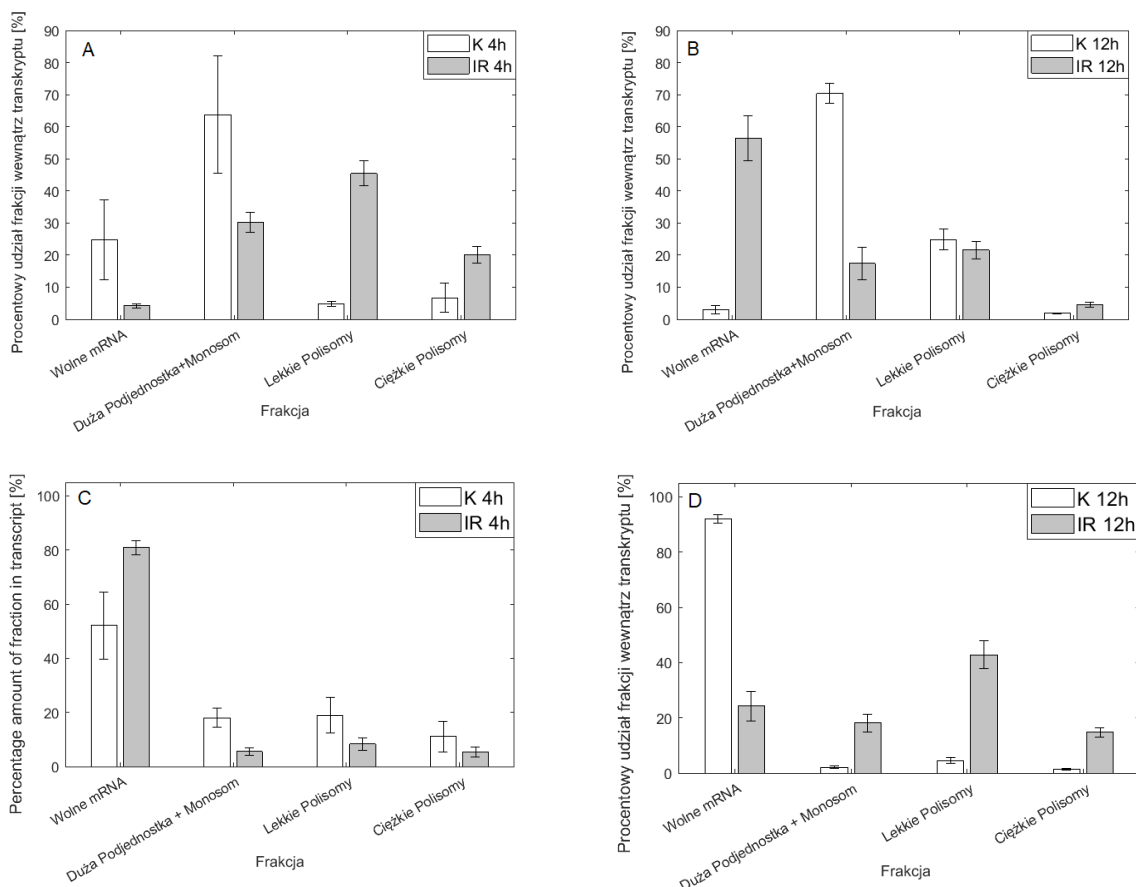
4 h po napromienianiu, obserwujemy ponad trzykrotny wzrost poziomu zarówno mRNA\_Bax, jak i białka Bax w stosunku do poziomu tych cząsteczek w komórkach kontrolnych. Po 12 h od napromieniania, poziom Bax w komórkach napromieniowanych nadal jest wyższy niż w komórkach kontrolnych, ale równocześnie jest już niższy niż 4 h po napromienieniu, co świadczy o wyhamowaniu translacji. Dane te są zgodne z oznaczonym profilem polisomalnym dla Bax (rys. 3): 4 h po potraktowaniu komórek promieniowaniem jonizującym, większość mRNA\_Bax znajduje się we frakcjach, w których mRNA ulega translacji (lekkie i ciężkie polisomy); w komórkach kontrolnych mRNA\_Bax występuje w większości we frakcji o niższej wydajności translacji (monosomy). Po 12 h mRNA\_Bax z komórek napromieniowanych znajduje się w większości we frakcji wolnych mRNA (mRNA nieulegające w danym momencie translacji), ale nadal ilość mRNA\_Bax we frakcji wydajnie ulegającej translacji (ciężkie polisomy) jest większa niż w komórkach nienapromieniowanych. W komórkach kontrolnych 12 h po napromienieniu mRNA\_Bax, podobnie jak po 4 h, występuje głównie we frakcji monosomów.

Poziom ekspresji miR-762 w komórkach traktowanych promieniowaniem wzrasta w stosunku do komórek kontrolnych 4 h po napromienianiu, ale 12 h po napromienianiu spada względem kontroli (rys. 2). Interesująco, w kontekście regulacji translacji, wygląda profil polisomalny miR-762: 4h po napromienianiu, miR-762 dominuje we frakcji wolnych mRNA, więc albo ulega wtedy transkrypcji, albo jest związany

z mRNA nieulegającym translacji. 12 h po napromieniowaniu, miR-762 w komórkach traktowanych promieniowaniem występuje głównie we frakcjach zawierających mRNA wydajnie ulegające translacji, a we frakcji wolnego mRNA występuje w niewielkiej ilości. Sugeruje to, że indukowana promieniowaniem transkrypcja miR-762 została wygaszona, a pozostałe w komórce miR-762 wyhamowuje translację białek.



Rys. 2. Poziom ekspresji miR-762 w komórkach HCT 116 traktowanych promieniowaniem jonizującym. Na wykresach przedstawiono względną poziom miR-762 w komórkach kontrolnych i napromieniowanych znormalizowanych do kontroli. 4 h, 12 h – czas inkubacji komórek po napromienieniu. Wyniki są średnią z 3 pomiarów z zaznaczonym odchyleniem standardowym.



Rys. 3. Profil polisomalny Bax (A, B) i miR-762 (C,D)

Na wykresach (rys. 3) przedstawiono udział procentowy transkryptu w obrębie danej frakcji zgodnie z [13]. Wyniki są średnią z 3 pomiarów z zaznaczonym odchyleniem standardowym.

### 3. Model translacji

Maszyna Turinga (MT) to prosta maszyna, składająca się z nieskończonej taśmy podzielonej na segmenty, w których zapisuje się symbole, głowicy zapisująco-odczytującej, poruszającej się wzdłuż taśmy [16] oraz z modułu sterującego, umożliwiającego interpretację oraz ruch głowicy w zależności od otrzymanych danych. Zastosowany w modelu translacji String Transducer [1] to jeden z uproszczonych wariantów MT: głowica może poruszać się tylko w jednym kierunku, obliczenia sprowadzają się do wyprodukowania nowej lub przepisania starej taśmy, długości wejścia i wyjścia nie muszą być takie same. Formalnie MT można zapisać w postaci krotki  $M=(Q, \Gamma, \Sigma, \delta, q_0, b, F)$ . Znaczenie symboli i przypisane im biologiczne analogi modelu translacji przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Znaczenie symboli opisujących MT 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 [], który jest przybierany za każdym razem po zapisaniu aminokwasu na nowej taśmie
$\Gamma$	Zbiór symboli z taśmy wyjściowej	Symbole aminokwasów + symbole dla kodonów STOP
$\Sigma$	zbiór symboli z taśmy wejściowej	symbole nukleotydów (A, U, G, C)
b	symbol pusty należący do zbioru $\Gamma$	S1, S2, S3 (symbole dla kodonów STOP)
$q_0$	stan początkowy maszyny	AUG (kodon START)
F	zbiór stanów końcowych maszyny	UAA, UAG, UGA (kodony STOP)
$\delta$	funkcja przejścia (L-w lewo; P-w prawo; S-brak ruchu)	Rybosom przesuwa się tylko w jedną stronę (założono od lewej do prawej)

#### 3.1. Założenia modelu translacji

W oparciu o dane literaturowe wprowadzono do opracowanego modelu translacji następujące założenia:

- (1) Niezależnie od długości transkryptu do jednego mRNA może się przyłączyć maksymalnie 15 rybosomów [2].
- (2) Pojedynczy rybosom pokrywa mRNA na szerokości 30 nukleotydów [3].
- (3) Czas tłumaczenia pojedynczego aminokwasu jest wartością indywidualną [5].
- (4) Uzależniono tempo translacji od stopnia upakowania rybosomów na mRNA [17].

(5) Brak regulacji miRNA w lekkich oraz ciężkich polisomach, gdyż wykazano, że mimo obecności miRNA we frakcjach polisomalnych, nie są one w stanie regulować translacji [7].

### 3.2. Opis algorytmu modelu translacji

W zaproponowanym modelu translacji opartym na MT, taśma reprezentuje łańcuch mRNA. Taśma wejściowa zawiera symbole reprezentujące nukleotydy (A, U, C, G), a taśma wyjściowa zbiór symboli odzwierciedlających sekwencję aminokwasową wraz z symbolami kodonów STOP. Głowica przesuwa się wyłącznie w prawo wzdłuż zadanej sekwencji nukleotydowej, a po napotkaniu kodonu START, maszyna zmienia stan na pozwalający rozpoczęcie symulacji i zapis na taśmie. Reguły działania maszyny są zdefiniowane w utworzonej przez użytkownika tabeli przejść. Głowica przesuwa się wyłącznie w prawo. Algorytm jest wykonywany do momentu pojawienia się jednego z trzech kodonów STOP. Liczba głowic na taśmie odzwierciedla eksperymentalnie wyznaczony profil polisomalny badanego mRNA.

Na wyjściu algorytm generuje dwie taśmy – pierwsza, z sekwencją odkodowanych aminokwasów, a druga z chwilami czasowymi, które opisują czas przyłączenia się tRNA (wg [5]) niosącego konkretny aminokwas. Finalnie maszyna jest w stanie określić czas translacji dla pojedynczego białka, który jest sumą wszystkich chwil czasowych dla wszystkich kodonów powiększoną o czas inicjacji translacji.

### 3.3. Podstawowy model translacji

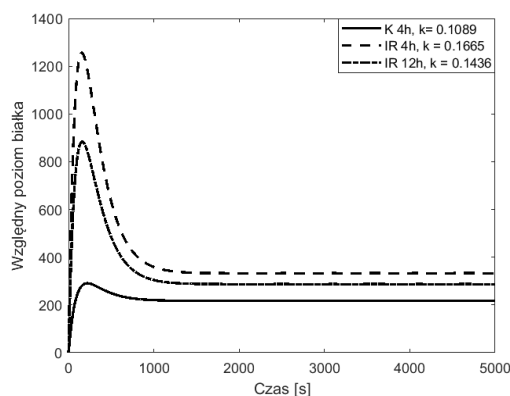
W celu sprawdzenie przydatności opracowanej metody modelowania procesu translacji, dokonano porównania otrzymanych wyników z wynikami bardzo prostego modelu opartego o równania różniczkowe opisujące poziomy transkryptu oraz białka:

$$\frac{dmRNA}{dt} = kprod_{mrna} - kdeg_{mrna} \cdot mRNA(t) \quad (1)$$

$$\frac{dP}{dt} = kprod_b \cdot mRNA(t) - kdeg_b \cdot P(t) \quad (2)$$

Współczynnik produkcji białka ( $kprod_b$ ) ustalono tak, by liczba wyprodukowanych cząsteczek białka w czasie  $t$  była taka sama jak w MT przy założeniu braku dodatkowej regulacji. W rzeczywistości, tempo produkcji białka zmienia się w zależności od zmian profilu polisomalnego wynikających z działania promieniowania jonizującego oraz miRNA. Można to łatwo uwzględnić w MT, natomiast byłoby to niezwykle trudne w modelu (1)-(2). W zależności od tego, które wyniki z MT zostały wykorzystane, otrzymuje się różne wartości współczynnika produkcji białka. Zmiany poziomu białka otrzymane z modelu (1)-(2) dla tych wartości współczynników zostały przedstawione na rysunku 4.

Symulacje zostały przeprowadzone 1000 razy dla czasu 5000 sekund. Liczba transkryptów dla przebiegów kontrolnych została ustalona na 40, natomiast w przypadku promieniowania, liczba transkryptów odpowiednio się zmieniała. Wyniki symulacji przedstawiają poziom białka względem kontroli.



Rys. 4. Względny poziom białka Bax wygenerowane przez model (1)-(2) przy założeniu stałych wartości współczynnika produkcji białka wyznaczonych z modelu MT dla 4 i 12 godzin po napromieniowaniu. Wartości współczynnika produkcji wyestymowane dla wyników z modelu MT dla K, IR 4 i IR 12h.

#### 4. Podsumowanie

Praca przedstawia działanie modelu translacji uwzględniającego wymuszenia w postaci promieniowania jonizującego i miRNA. Model oparto na MT, gdyż maszyna ta nie tylko pozwala na dobre odzwierciedlenie procesu translacji, ale przede wszystkim jest w stanie uwzględnić profil polisomalny, co w przypadku modeli opartych na równaniach różniczkowych jest praktycznie niemożliwe do wykonania. Model podstawowy oparty na równaniach różniczkowych oparty jest na założeniu stałego współczynnika translacji, a ten, jak wynika z działania modelu MT oraz wyników eksperymentalnych, jest zmienny w czasie. Gdyby wykorzystać model MT do wyestymowania wartości tego parametru, w zależności od tego, na której chwili czasu oparta byłaby estymacja, otrzymuje się różne wartości. Efekty symulacji modelu (1)-(2) dla różnych współczynników wyestymowanych z modelu MT, jak widać na rysunku 4, wyraźnie się różnią. Potwierdza to przewagę zaproponowanego modelu MT, w którym nie trzeba zakładać przebiegu zmiennego w czasie parametru.

#### LITERATURA

1. Alur R., Černý P.: Streaming transducers for algorithmic verification of single-pass list-processing programs. "Proceedings of the 38th annual ACM SIGPLAN-SIGACT symposium on Principles of programming languages", 2011, pp. 599-610.
2. Arava Y., Wang Y., Storey J. D, Liu C. L., Brown P. O., Herschlag D.: Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences 100.7 (2003): 3889-3894.
3. Brar G. A., Weissman J. S.: Ribosome profiling reveals the what, when, where and how of protein synthesis. Nature reviews Molecular cell biology 16.11 (2015): 651-664.
4. Chassé H., Boulben S., Costache V., Cormier P., Morales J.: Analysis of translation using polysome profiling. Nucleic acids research, vol.45(3), 2017, e15-e15.

5. Fluitt A., Pienaar E., Viljoen H.: Ribosome kinetics and aa-tRNA competition determine rate and fidelity of peptide synthesis. *Computational biology and chemistry* 31.5-6 (2007): 335-346.
6. Gandin V., Sikström K., Alain T., Morita M., McLaughlan S., Larsson O., Topisirovic I.: Polysome fractionation and analysis of mammalian translomes on a genome-wide scale. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, vol.(87), 2014, e51455.
7. Ghosh S. et al.: Polysome arrest restricts miRNA turnover by preventing exosomal export of miRNA in growth-retarded mammalian cells. *Molecular biology of the cell* 26.6 (2015): 1072-1083.
8. Hellen C. U.: Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol.10(10), 2018, a032656.
9. Hou R. et al.: miR-762 can negatively regulate menin in ovarian cancer. *OncoTargets and therapy* 10 (2017): 2127.
10. Jobe A., Liu Z., Gutierrez-Vargas C., Frank J.: New insights into ribosome structure and function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol.11(1), 2019, a032615.
11. Maroney P. A., Yu Y., Fisher J., Nilsen T. W.: Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature structural & molecular biology*, vol.13(12), 2006, pp.1102-1107.
12. Mukherjee S., Dutta A., Chakraborty A.: The cross-talk between Bax, Bcl2, caspases, and DNA damage in bystander HepG2 cells is regulated by  $\gamma$ -radiation dose and time of conditioned media transfer. *Apoptosis* 27.3 (2022): 184-205.
13. Panda A. C., Martindale J. L., Gorospe M.: Polysome fractionation to analyze mRNA distribution profiles. *Bio-protocol*, vol.7(3), 2017, e2126-e2126
14. Ranjan N., Leidel S. A.: The epitranscriptome in translation regulation: mRNA and tRNA modifications as the two sides of the same coin?. *FEBS letters*, vol.593(13), 2019, pp.1483-1493.
15. Schwanhäusser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Selbach M.: Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, vol.473(7347), 2011, pp.337-342.
16. Turing A. M.: On computable numbers, with an application to the Entscheidungsproblem. "Proc. Lond. Math. Soc." Vol.42, 1937, pp.230-265.
17. von der Haar T.: Mathematical and computational modelling of ribosomal movement and protein synthesis: an overview. *Computational and structural biotechnology journal* 1.1 (2012): e201204002.