

## **POVZETEK**

### **UVOD**

Sistemska biologije je področje biologije, ki biološke sisteme obravnava s sistemskega vidika ter poskuša razumeti njihove splošne lastnosti in zakone, ki jih obvladujejo. Njena metodologija temelji na abstraktnih modelih teh kompleksnih sistemov. Takšen teoretični pristop je nujen komplement redukcionistični paradigmi in omejenim eksperimentalnim metodam, ki ne dajeta želenih rezultatov. Teoretično biologijo moramo zato sprejeti kot koncept razmišljanja, ki nam bo pomagal razumeti kolektivno dinamiko kompleksnih mrež in omogočal napovedovanje njihovega obnašanja pri različnih začetnih pogojih in spremembah. Eden najbolj uspešnih abstraktnih modelov so Boolove mreže, s katerimi lahko na preprost način preučujemo spremembe dinamike mrež, ki jih povzroči spreminjanje različnih parametrov.

### **BOOLOVE MREŽE**

Boolove mreže sestavlja določeno število binarnih elementov ( $N$ ), ki so povezani z določenim številom usmerjenih povezav. Vsak od elementov ima pripisano eno izmed Boolovih funkcij, ki glede na permutacijo vhodnih vrednosti določi kakšna bo vrednost elementa. Število vhodov na element ( $K$ ) je lahko za vse elemente enako ali različno od elementa do elementa. Povezave in Boolove funkcije v določeni mreži ostanejo konstantne, spreminjajo pa se začetne vrednosti elementov iz katerih procesiramo mrežo. Pri procesiranju mreže se vrednosti elementov sinhrono spreminjajo, glede na njihove Boolove funkcije in vrednosti vhodov, in mreža tako sledi zaporedju diskretnih stanj.

Zaporedje stanj je deterministično in ga lahko predstavimo s krivuljo v faznem prostoru. Fazni prostor je matematično orodje za predstavitev obnašanja kompleksnih sistemov. Vsaka točka v faznem prostoru predstavlja stanje sistema, ki je enoznačno določeno z vrednostmi vseh njegovih spremenljivk. Krivulje, ki opisujejo časovno spreminjanje stanj sistema se imenujejo trajektorije. Trajektorije se stekajo v atraktorje, ki so končna stanja dinamike sistema. Atraktorji so lahko točkasti, kar pomeni, da je končno stanje nespremenljivo, ali ciklični, kar pomeni, da mreža kroži po ponavljajočem se zaporedju stanj. Vse trajektorije, ki se stekajo v isti atraktor, tvorijo atraktorski bazen. Pri perturbaciji mreža preskoči z ene trajektorije na drugo. Ta druga trajektorija se lahko steka v isti atraktor kot prejšnja, lahko pa v enega izmed drugih atraktorjev. Dolžina in število atraktorjev določata urejenost dinamike mreže.

Pionir preučevanja Boolovih mrež S. A. Kauffman je odkril »zastonjski red«, ki se pri določenih parametrih pojavi v teh mrežah. Njegove mreže so imele konstantno število vhodov na element in pri dveh vhodih na element ( $K=2$ ) je v njihovi dinamiki opazil močan fazni prehod iz nereda v red. Ocenil je, da sta dolžina in število atraktorjev pri  $K=2$  mrežah enaka  $\sqrt{N}$ , kar je izredno majhen delček faznega prostora, ki obsega  $2^N$  vseh možnih stanj (za  $N=100$  mreže je to  $2^{100}$  oz. približno  $10^{30}$  možnih stanj). Vir te urejenosti naj bi bili zamrznjeni elementi, katerih vrednosti se s časom ne spreminjajo.

Urejenost Boolovih mrež je sprožila vprašanje, ali je ta red zgolj posledica matematičnih idealizacij modela, ali obstaja tudi v realnih sistemih. Raziskovalci so si zato prizadevali ustvariti bolj realistične modele in preučiti njihovo dinamiko.

Asinhrono Boolove mreže so odpravile sinhrono računanje mrež, kontinuirane (zvezne) pa binarno idealizacijo spremenljivk. Pri obeh modelih se je izkazalo, da imajo pri enakih parametrih ( $N$  in  $K$ ) podobno stopnjo urejenosti. Neposredna primerjava dinamike s štetjem atraktorjev in primerjanjem njihove dolžine sicer ni možna, vendar pa merila, ki so specifična za vsako vrsto mrež, dajejo podobno oceno urejenosti.

Neenako število vhodov na element ( $K$ ) je bistvenega pomena za bolj realistično modeliranje, saj v naravnih sistemih število vhodov na element ni konstantno, kar potrjujejo tudi empirične raziskave. Naš model je eden izmed prvih modelov z neenakim  $K$ . Podoben model, ki pa se v nekaj pomembnih podrobnostih razlikuje od našega, je naredila le še ena skupina raziskovalcev. Naši rezultati se ujemajo z njihovimi ugotovitvami, da heterogena distribucija povezav uvede red v mrežo. Poleg določanja urejenosti mrež, naša raziskava zajema tudi dinamično diverziteteto mrež, homeostazo in spremembe faznega prostora pri spreminjanju matrike mreže.

## **GENETSKA INTERPRETACIJA MODELA**

Naš model sem interpretirala kot gensko mrežo, z manjšimi spremembami pa lahko predstavlja tudi metabolno ali ekološko mrežo. V genetski interpretaciji modela:

- elementi brez vhodov predstavljajo gene, katerih ekspresijo kontrolirajo izključno zunanji dejavniki, ne pa tudi drugi geni
- povezani elementi predstavljajo gene, katerih ekspresijo regulirajo geni (in lahko tudi zunanji dejavniki), in ki vplivajo na ekspresijo drugih genov
- elementi brez izhodov predstavljajo regulirane gene, ki ne vplivajo na ekspresijo drugih genov
- nepovezani elementi predstavljajo neregulirane gene, ki ne vplivajo na ekspresijo drugih genov, vendar so pomembni za organizem

## **METODE KONSTRUKCIJE MREŽ IN ANALIZE PODATKOV**

Boolovo mrežo določajo tri matrike, in sicer matrika elementov, matrika povezav in matrika funkcij. Naše mreže so imele 100 elementov in 200 povezav, razporejenih med njimi po dveh nekoliko spremenjenih binomskih distribucijah. Mrežam sem vnaprej določila število brezvhodnih elementov in nato po naključju razporedila povezave v mreži. Če so pri tem nastali dodatni brezvhodni ali nepovezani elementi, sem, da bi jih spremenila, vhode preusmerjala na dva različna načina (preusmerjanje enega vhoda ali naključnega števila vhodov). Za ugotavljanje lastnosti določene mreže sem mrežo procesirala iz različnih naključnih začetnih stanj. Za ugotavljanje lastnosti nekega tipa mrež pa sem naključno določila različne matrike povezav in funkcij, ki sem jih nato ravno tako procesirala iz različnih začetnih stanj.

Z metodo naključnih začetnih stanj je bilo v vsaki mreži najdeno neko število atraktorjev. Atraktorje sem nato perturbirala in štela, kolikokrat se je mreža vrnila v perturbiran atraktor in kolikokrat končala v drugih atraktorjih. Perturbacija

atraktorja je pomenila obrnjene vrednosti določenega števila naključno izbranih elementov. Perturbirala sem različno število povezanih elementov in naenkrat vse brezvhodne elemente. S perturbacijami atraktorjev sem našla tudi nove atraktorje, predvsem v mrežah z velikim številom prvotno najdenih atraktorjev. Nove atraktorje sem nadalje perturbirala in pogosto spet našla nove atraktorje. Perturbacije sem ponavljala, dokler nisem več našla novih atraktorjev. V nekaterih mrežah sem za primerjavo učinkovitosti metod ponovila iskanje atraktorjev še s povečanim številom naključnih začetnih stanj.

Zanimalo me je tudi, kakšne spremembe faznega prostora povzroči majhna sprememba matrike mreže, zato sem mrežam z enim brezvhodnim elementom dodala vhod na ta element.

Urejenost mrež sem ocenjevala s številom in dolžino atraktorjev, njihovo podobnostjo in velikostjo atraktorskih bazenov. Premik distribucij učinkovitih vhodov smo določili z računanjem verjetnosti zamrznjenja elementov. Pri perturbacijah atraktorjev sem za določanje homeostaze izračunavala relativno frekvenco vračanja v atraktor in s primerjavo frekvenc parov atraktorjev perturbacijsko recipročnost med njimi. Izračunala sem tudi korelacijo med krivuljami homeostaze mreže pri različnih načinih perturbacije in med krivuljo homeostaze in velikostjo atraktorskih bazenov. Pri dodajanju vhoda na brezvhodni element sem izračunala relativno frekvenco vračanja v izhodiščni atraktor, sumarno relativno frekvenco starih atraktorjev, delež novih atraktorjev v skupnem številu atraktorjev in sumarno relativno frekvenco vseh novih atraktorjev, ki so bili najdeni iz določenega atraktorja.

## REZULTATI

Povprečno in mediano število atraktorjev narašča približno eksponentno z naraščajočim številom brezvhodnih elementov, pri tem pa se linearno zmanjšuje podobnost atraktorjev. Mreže, ki nimajo nobenega brezvhodnega elementa, so najlažje primerljivi z mrežami drugih avtorjev. Mreže z neenakim  $K$  so bolj urejene kot mreže s konstantnim  $K$ . Distribucija števila atraktorjev v mrežah z različnim številom brezvhodnih elementov ostaja zelo podobna. Veliko je mrež z majhnim številom atraktorjev, malo pa mrež z velikim številom atraktorjev. Povprečna in mediana dolžina atraktorjev nista odvisni od števila brezvhodnih elementov. Tudi distribucija dolžin atraktorjev je zelo podobna v vseh mrežah. Veliko je atraktorjev s kratkimi cikli, malo je atraktorjev z dolgimi in zelo dolgimi cikli.

Brezvhodni elementi zmanjšujejo velikost zamrznjene in aktivne komponente, narašča pa velikost mešane komponente. Približno polovica zamrznjene komponente zamrzne zaradi kanaliziranosti Boolovih funkcij, ostala polovica pa zaradi dinamike mreže. Primerjava različnih distribucij pri upoštevanju učinkovitih vhodov je pokazala, da je najbolj heterogena potenčna distribucija, kar pomeni, da so mreže s to distribucijo najbolj urejene.

Homeostaza mrež pri perturbacijah povezanih elementov je zelo visoka. Zmanjšuje se z naraščajočim številom perturbiranih elementov in se pri 50 perturbiranih elementih približa ocenjeni velikosti atraktorskih bazenov. Vzorec homeostaze mreže je zelo podoben za različna števila perturbiranih elementov, nivo krivulj in njihove amplitude pa se znižujejo z naraščajočim številom

perturbiranih elementov. Homeostaza mreže v nekem atraktorju je pri perturbaciji povezanih elementov večinoma v korelaciji z velikostjo njegovega bazena, to pa ne velja pri perturbacijah brezvhodnih elementov. Homeostaza pri perturbaciji brezvhodnih elementov je zelo nizka in vzorec homeostaze se popolnoma razlikuje od tistega pri perturbaciji povezanih elementov, zato tudi ni v korelaciji z velikostmi atraktorskih bazenov.

Perturbacijska recipročnost atraktorjev je pokazala skupine atraktorjev z visoko medsebojno recipročnostjo, ki so skoncentrirani okoli diagonale perturbacijske tabele. To pomeni, da pri perturbacijah le atraktorji s podobno velikimi bazeni padajo drug v drugega. Skupine atraktorjev z visoko recipročnostjo pa verjetno kažejo tudi na strukturo faznega prostora, v katerem ti atraktorji tvorijo lokalni skupek.

Pri dodajanju vhoda na brezvhodni element se je fazni prostor mreže nekoliko spreminjal. Spreminjala se je velikost atraktorskih bazenov, nastali so tudi novi atraktorji. Spremembe so bile večinoma majhne, občasno pa so se pojavile velike spremembe, pri katerih so izginili posamezni atraktorji ali cele skupine atraktorjev.

## **ZAKLJUČKI**

V mrežah z neenakim  $K$  nastane velik delež elementov z majhnim številom vhodov in pri teh je verjetnost da zamrznejo večja, kot pri elementih, ki imajo veliko število vhodov. Urejenost dinamike mrež z neenakim  $K$  je tako odvisna od števila povezav in njihove distribucije. Distribucija, ki v mreže uvede največ reda je potenčna. Brezvhodni elementi povečujejo dinamično diverziteto mrež in imajo močan vpliv na njihovo homeostazo. Perturbacije brezvhodnih elementov mrežo večinoma preusmerijo v drug atraktor. To je pričakovano, saj je v takih mrežah velik del atraktorjev definiran s kombinacijo vrednosti teh elementov, zato sprememba kombinacije običajno pomeni drug atraktor.

Perturbacije atraktorjev so tudi zelo učinkovita metoda za raziskovanje lokalnega faznega prostora, saj pri tem najdemo nove atraktorje, ki jih z metodo naključnih začetnih stanj ne. Poleg števila atraktorjev ta metoda razkrije tudi njihovo relativno lokacijo in povezanost. Visoka perturbacijska recipročnost ravno tako kaže strukturo faznega prostora, saj visoko medsebojno prehajanje verjetno pomeni, da so ti atraktorski bazeni blizu skupaj, ali da so robovi njihovih bazenov nižji, kot pri ostalih atraktorjih.

Dodajanje vhoda v mrežo je spremenilo fazni prostor mreže. Spremembe so bile večinoma majhne, občasno pa so se pojavile tudi velike, pri čemer so nastali ali izginili atraktorji. Pojavljanje večjih sprememb je naključno, zato jih ni mogoče vnaprej predvideti, verjetno do tega pride takrat, ko dodana vez zelo spremeni dinamično strukturo mreže.

## **SISTEMSKA BIOLOGIJA**

Atraktorji v bioloških mrežah so npr. različni vzorci ekspresije genov ali združbe v sukcesiji ekosistemov. V genetski interpretaciji modela elementi brez vhodov predstavljajo gene, katerih ekspresijo regulirajo izključno zunanji dejavniki. Ti geni imajo močan vpliv na dinamično diverziteto genske mreže. Njihove perturbacije preusmerijo mrežo v drug atraktor oz. vzorec ekspresije. Mrežo lahko v drug

atraktor preusmeri tudi perturbacija večjega števila povezanih elementov oz. genov, katerih ekspresijo regulirajo drugi geni. Proces preusmerjanja genskih mrež poteka med celično diferenciacijo, med adaptacijo na zunanje spremembe, med normalnimi fiziološkimi procesi, ki spreminjajo ekspresijo genov, ali med patološkimi motnjami normalnega vzorca ekspresije.

Mutacije genov povzročijo spremembe v matrikah (povezav in/ali funkcij) mreže in s tem spremembe faznega prostora. Pri tem se spremenijo stari atraktorji in lahko nastanejo novi, ki so nove kombinacije ekspresije genov in se ne pojavljajo v normalnih tkivih. Zelo visoko mutabilnost in posledično hitro spreminjanje faznega prostora imajo maligno transformirane celice, kar jim omogoča, da so izredno prilagodljive in močno kompetitivne.

Strategija neprestanega, bolj ali manj hitrega, spreminjanja faznega prostora na vseh nivojih organizacije je eden od zakonov biološke evolucije. Hitrost spreminjanja je omejena z minimalni stabilnostjo biološke informacije. Spremembe faznega prostora so večinoma majhne, ravno tako kot spremembe v evoluciji, občasno pa se v faznem prostoru naključno pojavijo velike spremembe, ki so lahko vir evolucijskih novosti.

Drugi zakon evolucije biosfere pa določa smer razvoja proti naraščajoči kompleksnosti in nastanku emergenc. Zdi se, da je takšna smer razvoja določena tako s fizikalnimi, kot matematičnimi zakoni, saj je bolj kompleksna organizacija fizikalno (manjša produkcija entropije) in matematično (večja kompleksnost faznega prostora) favorizirana. Obe lastnosti sta očitno tudi evolucijsko prednostni.

Nedavne raziskave metabolnih mrež so pokazale, da je distribucija interakcij v teh mrežah potenčna in da imajo različno kompleksne mreže stalen premer. Skupno jedro vseh metabolnih mrež kaže na evolucijsko skupni izvor metabolizma. Potenčna distribucija interakcij naj bi bila značilna tudi za druge molekulske mreže v organizmih. Tudi genske mreže naj bi tako imele potenčno distribucijo interakcij in konstanten premer. To bi pomenilo, da tem bolj kompleksen je organizem, večja je povezanost genskih mrež, saj je potrebno njihovo medsebojno usklajevanje, da se lahko vzdržuje mnogocelični nivo organizacije.

Celotno mrežo vseh možnih medmolekulskih interakcij organizma si lahko predstavljamo kot časovno in prostorsko superpozicijo vseh potencialov molekularskih interakcij. Dejanske molekulske mreže so časovno in prostorsko definirane manifestacije delov potencialne mreže. Fazni prostor dejanske mreže obsega le del faznega prostora potencialne mreže, temu bi lahko rekli tudi hiperprostor organizma na molekularskem nivoju. Spremembe matrice mreže, ki so posledice mutacij ali biokemijskih reakcij z organizmu tujimi molekulami, se izrazijo le, če so del dejanskih podmrež. Te se neprestano spreminjajo, odvisno od prisotnosti molekul, njihove koncentracije in aktivnosti.

Vplivanje na mrežo preko brezvhodnih elementov je učinkovit način usmerjanja mrež v različne funkcionalne vzorce. Domnevam, da bi vzpostavitev povratne povezave (vhoda) na perturbiran brezvhodni element povečala homeostazo mreže. Ta princip bi lahko uporabili npr. pri zdravljenju raka in remediaciji

ekosistemov. Modeli kompleksnih mrež bodo omogočili napovedovanje učinkov, ki jih bodo imeli posegi vanje. To bi zelo izboljšalo uspešnost zdravljenja različnih bolezni z gensko terapijo, omogočalo napovedovanje posledic posegov v ekosisteme in njihovo zaščito, povečalo uspešnost biotehnološkega pridobivanja metabolnih produktov, omogočalo kontrolo ekspresije bakterijskih genov, model človeške metabolne mreže pa bi bil izredno uporaben za testiranje učinkov možnih zdravil in s tem doseganje njihove maksimalne učinkovitosti in minimalnih stranskih učinkov.

Moderne redukcionistične tehnologije so manj uspešne, kot se pričakuje od njih. Problem je v njihovi osnovni ideji, da celico lahko preusmeriš v zeleno smer preprosto z inhibicijo ali aktivacijo enega gena oz. proteina. Očitno postaja, da ni pomemben samo en element, ampak mreža interakcij med njimi. Razvoj uspešnih modelov molekulskih mrež organizma bo zato izredno odkritje, ki bo osnova za novo generacijo tehnologij, temelječih na ideji usmerjanja kolektivne dinamike mrež.

## **BODOČE RAZISKAVE BOOLOVIH MREŽ**

Bodoče raziskave mrež z neenakim  $K$  naj bi razkrile povezavo med spremembami parametrov ( $N$ ,  $K$  in distribucija povezav) in njihovo urejenostjo. Raziskave dinamike mrež bi bilo potrebno ponoviti v mrežah z večjim številom elementov ( $N=10\ 000$ ) in ekstrapolirati dinamiko na termodinamsko mejo ( $N \rightarrow \infty$ ). Ovrednotenje kontinuiranih modelov bi bilo nujno za nadaljni razvoj modeliranja bioloških sistemov. Ti so zelo pomembni z vidika spreminjanja vrednosti elementov v bioloških sistemih. Od empiričnih raziskav bi bila za razvoj modelov genskih mrež zelo pomembna analiza topoloških razlik med mrežami prokariotov in evkariontov ter enoceličnih in mnogoceličnih organizmov. Zelo zanimivo bi bilo modelirati evolucijsko rast mreže. Pomembna bi bila tudi raziskava, kako poškodbe mreže vplivajo na njeno homeostazo. Možno je, da se zaradi izgube elementov in povezav na neki točki pojavi hiter padec homeostaze in so zato v tem stanju lahko za sistem nevarne že najmanjše perturbacije. Takšni kritični sistemi bi bili npr. degradirani ekosistemi, poškodbe organizma ne različnih ravneh (metabolni, genetski, fiziološki), različne vrste stresa, ...

Zakaj bi bili ti abstraktni modeli tako pomembni za znanost? Ker razkrivajo splošne lastnosti kompleksnih dinamičnih mrež in matematične osnove reda v naravi. S preučevanjem teh vidikov reda, ki so zelo pomembni tudi v bioloških sistemih, se je sedaj, kot pomembna veja teoretične biologije, začela ukvarjati tudi novo nastajajoča sistemska biologija.