dr hab. Tomasz Lipniacki
Pracownia Modelowania w Biologii i Medycynie
Instytut Podstawowych Problemów Techniki PAN
02-106 Warszawa, Pawińskiego 5B

AUTOREFERAT

Moja aktywność naukowa koncentrowała się wokół trzech tematów:

A. Turbulencja kwantowa w nadciekłym helu (*tematyka rozprawy habilitacyjnej*)
B. Dynamika i termodynamika DNA
C. Modelowanie obrony immunologicznej oraz efektów stochastycznych i przestrzennych w sygnalizacji komórek (*aktualna tematyka badawcza*)

Sumarycznie swoje badania mogę scharakteryzować jako modelowanie procesów złożonych. Przez procesy złożone rozumiem procesy, dla których, nawet jeśli posiadamy dokładny opis matematyczny, rozwiązanie odpowiednich równań przekracza zdolności obliczeniowe komputerów. Taką sytuację mamy w przypadku turbulencji zarówno w płynach klasycznych, jak i nadciekłym helu. Opis poprzez równanie Naviera-Stokesa czy równanie Grossa-Piteevskiego (dla helu w temperaturze zera bezwzględnego) jest opisem satysfakcjonującym dla szerokiej klasy problemów. Niemniej rozwiązanie analityczne, jak i numeryczne obu równań jest poza szczególnymi przypadkami niemożliwe. Podobną sytuację mamy w przypadku dynamiki biologicznych makromolekuł, DNA i białek - opis poprzez drobnoskalową dynamikę molekularną opartą o pola sił uwzględniających oddziaływania elektrostatyczne, Van der Waalsa, hydrofobowe i tworzenie się wiązań wodorowych, jest zazwyczaj wystarczający, jednakże złożoność numeryczna problemu uniemożliwia przewidzenie struktury białka czy DNA tylko w oparciu o sekwencje aminokwasów czy zasad tworzących łańcuch DNA. W przypadku turbulencji w nadciekłym helu oraz dynamiki DNA analiza zjawisk wymaga budowy modeli na tyle uproszczonych, by możliwa była ich (przynajmniej) numeryczna analiza, a z drugiej strony na tyle dokładnych, by uzyskane rozwiązania stanowiły satysfakcjonujące przybliżenie badanych procesów.

W przypadku analizy procesów regulatorowych w komórce sytuacja jest jeszcze trudniejsza. Poprawny opis sieci oddziaływań między białkami, mRNA i DNA nie jest znany - co więcej nieznana jest nawet struktura większości oddziałujących białek. W tym przypadku zadaniem modelowania jest odgadnięcie stochastycznego systemu dynamicznego w oparciu o dane eksperymentalne (przeważnie czasowe profile ekspresji białek i mRNA). Stochastyczność układu związana jest z niewielką ilością molekuł poszczególnych białek, mRNA, czy kopii genów w komórce. Jak można się spodziewać dane eksperymentalne nie określają układu dynamicznego w sposób jednoznaczny. Weryfikacja postawionych hipotez wymaga zatem dodatkowych eksperymentów.

Poniżej omawiam wyniki swoich badań w oparciu o najważniejsze publikacje w których jestem "korespondencyjnym autorem"

1. Turbulencja kwantowa w nadciekłym helu

Publikacje

(A1) T. Lipniacki, Dynamics of superfluid Helium - Limits of the Vinen model, Arch. Mech., 49 (4): 615-633 (1997).

(A2) T. Lipniacki, Evolution of quantum vortices following reconnection, Eur. J. Mech. B/Fluids 19: 361-378 (2000).

(A3) T. Lipniacki, Dynamics of superfluid He: Two-scale approach, Eur. J. Mech. B/Fluids 25: 435-458 (2006).

(A4) T. Lipniacki, Evolution of line-length density and anisotropy of quantum tangle, Phys. Rev. B 64: 214516-1-9 (2001).

(A5) T. Lipniacki, Quasi-static solution for quantum vortex motion under the localized induction approximation, J. Fluid Mech. 477: 321-337 (2003).

(A6) T. Lipniacki, Shape-preserving solutions for quantum vortex motion under localized induction approximation, Phys. Fluids 15: 1381-1395 (2003).

(A7) M. Kursa, K. Bajer, T. Lipniacki, Cascade of vortex loops initiated by a single reconnection of quantum vortices, Phys. Rev. B 83: 014515 (2011).

Zgodnie z dwupłynowym modelem Landau'a, hel II (nadciekły He 4) jest mieszaniną składowej nadciekłej (kondensat Bosego) oraz składowej lepkiej unoszącej całość entropii. Sprzężenie dynamiki obu składowych odbywa się za pośrednictwem tak zwanych wirów kwantowych, jednowymiarowych osobliwości unoszących wirowość składowej nadciekłej. Przepływ ciepła (powodujący przeciwbieżny ruch składowych – *counterflow* V_{ns}), jak i turbulencja składowej normalnej prowadzą do powstania turbulencji kwantowej tj. stanu o dużej gęstości (do 100 km linii wirowej w cm^3 cieczy) splątanych nici wirowych.

W czasie gdy rozpoczynałem pracę nad dynamiką nadciekłego helu istniały dwa satysfakcjonujące (lecz o ograniczonej stosowalności) modele opisu dynamiki wirów kwantowych w nadciekłym helu: Model HVBK (Hall-Vinen-Bekarevich-Khalatnikov) adekwatny do opisu lokalnie uporządkowanego (równoległego) układu wirów, oraz model Vinena opisujący quasi-izotropową turbulencję kwantową. Równanie Vinena, w którym człon produkcji gęstości wirów kwantowych jest proporcjonalny do wartości pola *counterflow* nie jest w stanie opisać szybko zmiennego pola *counterflow*, wymuszającego depolaryzacje kłębowiska wirowego. Problem opisu anizotropowej turbulencji kwantowej, czyli stanu, w którym skłębione wiry kwantowe unoszą makroskopową wirowość składowej nadciekłej był również otwarty. Należy zauważyć, że quasi-izotropowa turbulencja jest bardzo szczególnym przypadkiem - powstaje ona wyłącznie na skutek jednorodnego pola *counterflow* wywołanego przepływem ciepła.

O niestosowalności modelu Vinena do opisu anizotropowej (rotującej) turbulencji przekonałem się przy próbie analizy zjawiska *spin-up* w nieskończonym cylindrze (praca **A1**). Schemat procesu jest następujący: ruch bocznych ścianek cylindra wymusza ruch składowej normalnej i powstanie *counterflow*, co prowadzi do rozwoju turbulencji kwantowej i wystąpienia siły sprzęgającej obie składowe. W rezultacie dochodzi do rozkręcenia również składowej nadciekłej. Analiza procesu wykazała jednak wewnętrzną sprzeczność opisu w ramach modelu Vinena: gęstość wirów kwantowych wyznaczona z równania Vinena była ponad 10-krotnie mniejsza niż gęstość wirów obliczona na podstawie profilu składowej nadciekłej. Oznacza to, że model Vinena nie jest adekwatny do opisu dynamiki helu II w przypadku przepływów z makroskopową wirowością.

Postanowiłem zatem rozwinąć teorię Vinena tak, aby była w stanie opisać ewolucję anizotropowego kłębowiska wirowego. Najpierw, w pracy **A2** pokazałem, że równanie typu równania Vinena może być wyprowadzone w oparciu o rozważania dotyczące dynamiki segmentów linii wirowych po rekoneksji. Następnie w pracy **A3**, skonstruowałem model dynamiki helu II dla przepływów generujących anizotropową turbulencję kwantową. W modelu tym makroskopowe równania Eulera (dla składowej nadciekłej) i Navier-Stokesa (dla składowej normalnej) sprzężone są polem siły tarcia F_{ns} zależnej od gęstości wirów L i pola counterflow V_{ns}. Gęstość L wyznaczona jest w oparciu o zmodyfikowane równanie Vinena uzględniające dryf wirów, oraz wpływ anizotropii kłębowiska wirowego na tempo namnażania i zaniku wirów. W oparciu o zbudowany model przeanalizowałem zjawiska stacjonarnej turbulencji kwantowej w obracającym się cylindrze oraz powstawania przepływu ścinania pomiędzy dwoma nieskończonymi równoległymi powierzchniami.

Równolegle do analizy problemu wirującej turbulencji zająłem się problemem opisu ewolucji gęstości wirów L i anizotropii kłębowiska wirowego w szybkozmiennym polu *counterflow* generowanym termicznie. Zbudowany model pozwala analizować ewolucję L w przypadku periodycznego *counterflow* o zmiennym kierunku. Zgodnie z przewidywaniem modelu dla danej amplitudy wymuszenia istnieje krytyczna wartość częstotliwości, powyżej której kłębowisko wirowe nie może być już podtrzymywane.

Analiza dynamiki wirów po rekoneksji, jaką przeprowadziłem w pracy **A2**, zasugerowała istnienie samopodobnych rozwiązań dla ruchu linii wirowych w przybliżeniu lokalnej samoindukcji. W pracach **A5 i A6** znalazłem trzy klasy takich rozwiązań dla dynamiki wiru kwantowego $\mathbf{s}(\xi,t)$ ($\mathbf{s}$ – wektor wodzący, ξ – długość łuku, t – czas)

$$\frac{d\mathbf{s}}{dt}(\xi,t) = \beta \frac{d\mathbf{s}}{d\xi} \times \frac{d^2\mathbf{s}}{d\xi^2} + \alpha \frac{d^2\mathbf{s}}{d\xi^2}, \tag{1}$$

gdzie $\alpha \geqslant 0$ jest bezwymiarowym współczynnikiem tarcia. W przypadku $\alpha = 0$ równanie (1) jest równoważne nieliniowemu równaniu Schrödingera na funkcję falową $\Psi = c\exp\left(i\int_0^\xi \tau d\bar{\xi}\right)$, gdzie c jest krzywizną, a τ torsją.

W pracy **A5** pokazałem, że, mimo iż równanie (1) (dla $\alpha > 0$) jest dysypatywne, a linia wirowa skraca się, to istnieje 4-parametrowa rodzina rozwiązań $\mathbf{s}(\xi,t)$ tego równania opisujących

nieskończoną linię wirową zachowującą zarówno kształt, jak i skalę przestrzenną. Dla rozwiązań tych, dla dowolnego czasu $t \in R$ istnieje izometria $\mathcal{T}(t)$ taka, że

$$\mathbf{s}(\xi, t) = \mathcal{T}(t)\ \mathbf{s}(\xi, 0)\ . \tag{2}$$

Znalazłem też jednoparametrową podrodzinę tych rozwiązań (w przypadku gdy $\mathcal{T}(t)$ jest translacją) w postaci analitycznej.

W pracy **A6** pokazałem istnienie dwóch 4-parametrowych klas rozwiązań równania (1) opisujących ewolucję linii wirowej zachowującej kształt. Dla rozwiązań tych równań ruch linii wirowej jest równoważny złożeniu jednokładności i rotacji. Dla I klasy rozwiązań skala przestrzenna rośnie jak $\sqrt{t}$, a rozwiązanie $\mathbf{s}(\xi, t)$ określone jest dla $t > 0$

$$\mathbf{s}(\xi, t) = \Omega(t)\ \sqrt{t}\ \mathbf{S}\Big(\frac{\xi}{\sqrt{t}}\Big) = \Omega(t)\ \sqrt{t}\ \mathbf{S}(l)\ , \tag{3}$$

gdzie $\Omega(t)$ jest operatorem rotacji. Dla II klasy rozwiązań skala przestrzenna maleje jak $\sqrt{-t}$, a rozwiązanie $\mathbf{s}(\xi, t)$ określone jest dla $t < 0$.

Najprostszym i jednocześnie najstotniejszym fizycznie rozwiązaniem samopodobnym o rosnącej skali przestrzennej jest rozwiązanie, w którym linia wirowa dla $t = 0$ jest sumą dwóch półprostych o wspólnym początku. Taka konfiguracja powstaje w wyniku wyidealizowanej rekonneksji dwóch prostych linii wirowych. Okazuje się, że jeśli kąt pomiędzy półprostymi (przełączającymi się liniami) jest mniejszy niż ok. 8 stopni, to linia wirowa zadana przez równanie (3) ma samoprzecięcia. Rozwiązanie to (otrzymane w przybliżeniu lokalnej samoindukcji) jest oczywiście niefizyczne. Niemniej, istnienie tego niefizycznego rozwiązania sugeruje, że rekoneksja linii wirowych pod dostatecznie małym kątem prowadzi do serii wtórnych rekoneksji i powstania kaskady pętli wirowych. Zjawisko to mogłoby być odpowiedzialne za zanik turbulencji kwantowej w granicy zera bezwzględnego, w której dyssypacja energii poprzez oddziaływanie wirów kwantowych ze składową normalną przestaje być efektywna. Postawiłem ten problem mojemu magistrantowi Mironowi Kursie, który w oparciu o symulacje równania Biota-Savarta, a następnie Grossa-Pitaeevskiego wykazał, że faktycznie rekoneksja linii wirowych pod dostatecznie małym kątem (rzędu 10 stopni) prowadzi do produkcji kaskady pętli wirowych o narastających średnicach. W rezultacie otrzymaliśmy równanie zaniku turbulencji kwantowej poprzez emisję małych pętli wirowych, przenikających przez kłębowisko i anihilujących na ściance, praca **A7.**

2. Dynamika i termodynamika DNA

Publikacje

(B1) T. Lipniacki, Non linear mechanical model of DNA dynamics, Nuovo Cimento D 20: 831-843 (1998).

(B2) T. Lipniacki, Chemically driven traveling waves in DNA, Phys. Rev. E, 60: 7253-7561 (1999).

(B3) T. Lipniacki, Thermodynamics of local DNA openings, Phys. Rev. E 64: 051919-1-5 (2001).

DNA ma formę długich i cienkich nici składających się z dwóch wewnętrznych łańcuchów zbudowanych z zasad azotowych (guaniny, cytozyny, adeniny i tyminy), których sekwencja koduje informację genetyczną, oraz dwóch bocznych łańcuchów cukrowo-fosforanowych. Najpowszechniejszą konfiguracją DNA jest prawoskrętna helisa (B-DNA) posiadająca ok. 11 par zasad na jeden zwój DNA. Drugą ważną formą DNA jest lewoskrętna helisa (Z-DNA) o 12 zasadach na jeden zwój. Skręcenie nici DNA zapewnia jej stabilność uniemożliwiając rozdzielenie łańcuchów cukrowo-fosforanowych oplatających sekwencję par zasad. Struktura DNA musi być jednak naruszona w procesie transkrypcji mRNA, gdy materiał genetyczny DNA wykorzystywany jest jako matryca do syntezy mRNA. Dochodzi wtedy do lokalnego (na długości około 30 par zasad) rozkręcenia i rozseparowania łańcuchów bocznych. Taki otwarty „bąbel" porusza się następnie wzdłuż DNA umożliwiając enzymowi polimerazy RNA zbudowanie molekuły mRNA będącej kopią wybranego genu. Lokalna zdolność DNA do tworzenia transkrypcyjnego bąbla inicjującego ekspresję genu (syntezę mRNA) regulowana jest momentem skręcenia nici - im silniej skręcona jest nić DNA, tym trudniej jest ją lokalnie rozkręcić i rozseparować boczne łańcuchy.

W pracy B1 zaproponowałem mechanistyczny model dynamiki łańcucha DNA, w którym pary zasad traktowane są jako sztywne sztabki, każda o dwóch stopniach swobody opisujących obrót wokół osi symetrii (osi DNA) i ruch wzdłuż tejże osi. Energia potencjalna łańcucha jest sumą energii oddziaływania hydrofobowego pomiędzy sąsiednimi parami zasad i energii sprężystej bocznych łańcuchów. Tak opisany łańcuch DNA posiada dwa minima energii: konfigurację lewo- i prawo-skrętnej helisy. Zakładając harmoniczną postać potencjału, wyprowadziłem równania Euler-Langrange'a czwartego stopnia i znalazłem ich analityczne rozwiązania opisujące homokliniczne i heterokliniczne fale biegnące. Fala homokliczna opisuje ruch lokalnego rozkręcenia wzdłuż łańcucha, a fala heroklinicznа przejście pomiędzy dwoma formami B-DNA i Z-DNA.

W pracy B2, będącej kontynuacją **B1**, uwzględniłem dysypację energii i wpływ enzymu polimerazy RNA na ruch DNA. Zakładając, że boczne łańcuchy zachowują swoją długość, dowiodłem istnienia wymuszonych przez ruch polimerazy RNA fal rozkręceniowych (rozwiązania homokliniczne) propagujących się nieograniczenie wzdłuż łańcucha. Dla rozwiązań tych dysypacja energii w DNA równoważona jest przekazem energii od polimerazy RNA, która zachowuje się jak molekularny motor. Przekaz energii odbywa się poprzez modyfikacje (lokalne osłabienie) potencjału hydrofobowego, co powoduje, że DNA rozkręca się w sąsiedztwie polimerazy, gdyż tam rozseparowanie sąsiednich par zasad jest łatwiejsze.

Rozwiązania z prac **B1 i B2** opisują fale rozkręceniowe propagujące się wzdłuż DNA. Jasne jest, że rozkręcenie łańcuchów jest warunkiem koniecznym do ich separacji, umożliwiającej proces transkrypcji. **W pracy B3** pokazałem w oparciu o symulacje dynamiki molekularnej w termostacie metodą Nose-Hoovera, że jest to również warunek dostateczny, w tym sensie, że miejscowe rozkręcenie DNA i obniżenie potencjału hydrofobowego prowadzi na skutek drgań termicznych do lokalnej denaturyzacji DNA (rozdzielenia par zasad i separacji bocznych łańcuchów).

3. Modelowanie obrony immunologicznej i efektów stochastycznych i przestrzennych w sygnalizacji komórek.

Modelowanie procesów regulatorowych w komórce, które rozpocząłem w czasie stażu na Rice University we współpracy z M. Kimelem i A. Brasierem, stanowi trzon mojej aktualnej działalności naukowej. Tematyka ta była przedmiotem prowadzonych przeze mnie prac doktorskich i jest kontynuowana w mojej grupie badawczej związanej z projektem Team.

Publikacje

Stochastyczna ekspresja genów

(C1) T. Lipniacki, P. Paszek, A. Brasier, A. Marciniak-Czochra, M. Kimmel, Transcriptional stochasticity in gene expression. J. Theor. Biol. 238: 348-367 (2006).

(C2) B. Hat, P. Paszek, M. Kimmel, K. Piechór, T. Lipniacki, How the number of alleles influences gene expression, J. Stat. Phys. 128: 511-533 (2007).

Modele odpowiedzi na stres

(C3) T. Lipniacki, P. Paszek, A. Brasier, B. Luxon, M. Kimmel, Mathematical model of NF-kappaB regulatory module J. Theor. Biol. 228: 195-215 (2004).

(C4) T. Lipniacki, P. Paszek, A. Brasier, B. Luxon, M. Kimmel, Stochasticity in early immune response. Biophysical Journal, 90: 725-742 (2006).

(C5) T. Lipniacki, K. Puszynski, P. Paszek, A. R. Brasier, M. Kimmel, Single TNFα trimers mediating NF-κB activation: Stochastic robustness of NF-κB signaling. BMC Bioinformatics 8: 376 (2007).

(C6) S. Tay, J. J. Hughey T. K. Lee, Lipniacki S. R. Quake, M. W. Covert Single-cell NF-kB dynamics reveal digital activation and analogue information processing, Nature 466: 267-272 (2010).

(C7) T. Lipniacki, B. Hat, J. R. Faeder, W. S. Hlavacek, Stochastic effects and bistability in T cell receptor signaling. J. Theor. Biol. 254 110-122 (2008).

(C8) K. Puszynski, B. Hat, T. Lipniacki, Oscillations and bistability in the stochastic model of p53. J. Theor. Biol. 254: 452– 465 (2008).

(C9) K. Puszynski, R. Bertolusso, T. Lipniacki, Crosstalk between p53 and NF-kappa B systems: pro- and anti-apoptotic functions of NF-kappa B, IET Sys. Biol. 3: 356-367 (2009).

(C10) B. Hat, K. Puszynski, T. Lipniacki, Exploring mechanisms of oscillations in p53 and NF-kappa B systems IET Sys. Biol. 3: 342-355 (2009).

Efekty przestrzenne w sygnalizacji komórek

(C11) B. Kazmierczak, T. Lipniacki, Regulation of kinase activity by diffusion and feedback J. Theor. Biol. 259: 291-296 (2009).

(C12) B. Kazmierczak, T. Lipniacki Spatial gradients in kinase cascade regulation IET Sys. Biol. 4: 348–355 (2010).

(C13) B. Hat, B. Kazmierczak, T. Lipniacki, B cell activation triggered by the formation of the small receptor cluster: a computational study, PLoS Comp. Biol. (2011) w druku.

Jednostkami funkcjonalnymi DNA są geny. Synteza białek (ekspresja genów), składa się z następujących głównych podprocesów: (1) regulacji transkrypcji poprzez wiązanie specyficznych białek regulatorowych do promotora genu, co powoduje jego aktywację lub inhibicję, (2) transkrypcji mRNA, tj. syntezy molekuł mRNA na podstawie matrycy DNA aktywnego genu, (3) syntezy białka w oparciu o matryce mRNA. Procesy regulatorowe mogą być rozumiane jako stochastyczne procesy dynamiczne oparte o macierze reakcji białko-białko (powstawanie kompleksów białkowych, aktywacja wzajemna białek itp.), białko-gen (regulacja aktywności genu przez białko) lub białko-mRNA. Charakterystycznymi elementami sieci regulatorowych są sprzężenia zwrotne oraz kaskady sygnałowe przekazujące i wzmacniające sygnał poprzez aktywację kolejnych poziomów kinaz białkowych. Zadaniem wczesnej (nieswoistej) obrony immunologicznej jest odebranie sygnału o infekcji i uruchomienie ciągu reakcji obronnych ograniczających namnażanie się patogenów.

Mała ilość reagujących molekuł (danego typu) prowadzi do dużej stochastyczności procesów regulatorowych. Jednym z podstawowych źródeł tej stochastyczności jest ekspresja genów. W diploidalnych komórkach eukariotycznych geny występują w dwóch kopiach, charakterystyczna liczba molekuł mRNA jest rzędu od kilku do kilkuset, a liczba molekuł białek sięga kilkudziesięciu bądź kilkuset tysięcy – w zależności od rodzaju białka. W rezultacie, stochastyczna aktywacja pojedynczej kopii genu na skutek przyłączenia czynnika transkrypcyjnego może prowadzić do systezy kilkuset molekuł mRNA, a następnie dziesiątek tysięcy molekuł białka. Podobny efekt występuje przy aktywacji komórek - aktywacja receptora na skutek przyłączenia ligandu, prowadzi do aktywacji kaskady kinaz i wielokrotnego wzmocnienia sygnału. Stochastyczność odgrywa istotną rolę w procesach regulatorowych umożliwiając różnicowanie odpowiedzi komórek w populacji w odpowiedzi na stres.

Modelowanie efektów stochastycznych rozpocząłem od analizy procesu ekspresji mRNA i białek w małych układach genów. Doświadczenie uzyskane z analizy takich prostych układów regulatorowych pozwoliło mi na konstrukcję stochastycznych modeli związanych z obroną immunologiczną i odpowiedzią na uszkodzenie DNA. W pracy **C1** zaproponowaliśmy model, w którym zmienne opisujące poziom mRNA i białka traktowane są jako ciągłe, a cała stochastyczność związana jest ze stanem genu (genów). Tak opisany proces ma charakter kawałkami ciągłego stochastycznego procesu Markowa i może być opisany przez układ równań zwyczajnych dla poziomu mRNA i poziomu białka o stochastycznie zmiennych współczynnikach (tzw. równań losowych). Równania te posłużyły do wyprowadzenia, w oparciu o analogie do mechaniki płynów, układu równań cząstkowych pierwszego rzędu dla dwuwymiarowej gęstości prawdopodobieństwa - gęstość prawdopodobieństwa (w funkcji czasu) jest naturalną funkcją opisującą stan stochastycznego układu regulatorowego. Rozpatrzone zostały dwa przykłady: regulacja autorepresyjnego pojedynczego genu oraz układy dwugenowe: represor-represor i aktywator-represor. Badania stochastycznej ekspresji genów były następnie kontynuowane przez moją doktorantkę Beatę Hat, która analizowała wpływ ilości kopii genu na jego ekspresję (praca **C2**). Motywacją do tych badań była zmiana ilości

kopii genu podczas cyklu komórkowego oraz w procesach nowotworzenia. Wykazaliśmy, że w przypadku gdy aktywność genu jest regulowana poprzez dodatnie sprzężenie zwrotne, duplikacja genu bądź utrata jednej z kopii prowadzi do jakościowej zmiany odpowiedzi układu na stymulację.

Prace nad modelowaniem nieswoistej odpowiedzi immunologicznej rozpocząłem od budowy matematycznego modelu sieci regulatorowej NF-κB, jednego z dwóch (obok IRF3) najważniejszych czynników transkrypcyjnych regulujących odpowiedź komórek na infekcję (praca **C3**). Białko NF-κB reguluje ekspresję kilkuset genów. Model opisuje kinetykę czterech białek (oraz ich kompleksów), transkrypcję mRNA, syntezę białek i ich transport pomiędzy jądrem i cytoplazmą, rys. 3. Zaproponowany mechanizm regulatorowy zawiera dwie pętle ujemnego sprzężenia zwrotnego; NF-κB uruchamia ekspresję dwóch swoich inhibitorów: IκBα i A20. Matematyczna reprezentacja modelu składa się z 14 równań różniczkowych zwyczajnych. Zaproponowany model, rozwijany w następnych pracach, uzyskał status jednego z dwóch podstawowych modeli matematycznych systemu NF-κB. W pracy **C4** zaproponowaliśmy model stochastyczny uwzględniający efekty losowe związane z aktywacją i dezaktywacja inhibitorów NF-κB tj. IκBα i A20. Analiza kinetyki pojedynczych komórek (tj. odpowiadających im realizacji symulacji stochastycznych), wykazała istnienie nieregularnych translokacji NF-κB pomiędzy jądrem a cytoplazmą. O ile pierwsza oscylacja była dobrze zsychronizowana to dla dłuższych czasów synchronizacja komórek malała. W rezultacie trajektoria uśredniona po populacji komórek wykazywała szybko gasnące oscylacje (takie jak obserwowane w eksperymentach populacyjnych), podczas gdy pojedyncze komórki oscylowały nieprzerwanie. Przewidywania modelu okazały są zgodne z eksperymentami grupy M.R.H. White'a przeprowadzonymi na pojedynczych komórkach.

W roku 2006 grupa A. Hoffmanna i A. Levchenko zbadała w eksperymencie populacyjnym odpowiedź układu NF-κB na stymulacje komórek w szerokim zakresie stężeń cytokiny TNF. Eksperyment wykazał wyraźną aktywacje komórek dla stężenia TNF równego 0.1 ng/ml i słabą aktywację dla stężenia 0.01 ng/ml. Prosty rachunek pokazuje, że przy stężeniu 0.01ng/ml w charakterystycznej objętosci medium równej objętości komórki znajduje się mniej niż jedna molekuła cytokiny TNF. Sugeruje to, że proces aktywacji dla małych stężeń jest stochastyczny i aktywowana jest tylko niewielka frakcja komórek. Pod wpływem tego eksperymentu zapostulowaliśmy model stochastycznej aktywacji komórek, stawiając kontrowersyjną hipotezę, że do aktywacji komórki wystarczy przyłączenie jednego trimera TNF. Zaproponowany mechanizm wzmocnienia oparty był o kaskadę kinaz (praca **C5**). Postawiona hipoteza została zweryfikowana 3 lata później w ekperymencje przeprowadzonym w Stanford przez grupę M. Coverta i S. Quake (praca **C6**) i potwierdzona dla innej linii komórkowej w laboratorium M.R.H. White'a. W pracy **C6** wykazaliśmy, że poniżej stężenia 1 ng/ml, frakcja zaaktywowanych komórek maleje wraz ze stężeniem TNF do wartości ok. 5% dla 0.01 ng/ml. Zgodnie z przewidywaniem modelu w aktywnych komórkach średnia ekspresja inhibitorów NF-κB jest niezależna od stężenia TNF. Esperyment wykazał jednak duże znaczenie wyjściowego zróżnicowania komórek w populacji, nieuwzględnionego w modelu zbudowanym w pracy **C5**. Zaproponowany przeze mnie eksperyment, w którym komórki stymulowane były

dwoma słabymi pulsami TNF, pozwolił na oszacowanie wartości wewnętrznego (intrinsic), jak i zewnętrznego (extrinsic) szumu i ulepszenie modelu.

W czasie swojego stażu naukowego w Los Alamos National Laboratories podjąłem we współpracy z dr W. Hlavackiem i J. Faederem pracę nad modelowaniem adaptacyjnej obrony immonologicznej. W rezultacie zbudowaliśmy stochastyczny model sygnalizacji tymocytów odpowiedzialnych za eliminację zainfekowanych badź zmutowanych komórek, praca **C7**. Zaproponowany model wyjaśnia zagadkową aktywację tymocytów poprzez pojedyncze molekuly stabilnie wiążących się polipetydów (z oczekiwanym czasem wiązania powyżej 10 s) oraz inhibicję komórek na skutek przyłączania ligandów o krótszym czasie wiązania. Model oparty jest o mechanizm "proofreading" i wzajemnie powiązane sprzeżenia ujemne i dodatnie.

W roku 2007 chcąc uzyskać pełniejszy obraz możliwych odpowiedzi komórek na stres rozpocząłem, wpólnie z moimi doktorantami Beatą Hat i Krzysztofem Puszyńskim, analizę układu p53 - czynnika transkrypcyjnego aktywowanego w wyniku uszkodzenia DNA i regulującego ekspresję genów odpowiedzialnych za proces naprawy DNA oraz apoptozę komórki gdy naprawa ta jest niemożliwa. Zaproponowany przez naszą grupę stochastyczny model regulacji p53 oparty jest o ujemne i dodatnie sprzężenie regulatorowe, praca **C8**. Sprzężenie ujemne powoduje obserwowane doświadczalnie oscylacje poziomów p53 i jego inhibitora w odpowiedzi na uszkodzenie DNA. Sprzężenie dodatnie, przerywające sprzężenie ujemne prowadzi do stabilizacji p53 na bardzo wysokim poziomie i w efekcie do apoptozy komórki. Opóźnienie związane z długą pętlą dodatniego sprzężenia działa jak zegar, zapewniający kilkanaście godzin na naprawę DNA, a gdy ta nie zostanie ukończona, kierujący komórki na scieżkę apoptozy. Stochastyczność procesu powoduje, że populacja komórek naświetlonych promieniowaniem jonizującym dzieli się na komórki, które zdołały naprawić DNA i komórki apoptotyczne. Frakcja komórek apoptotycznych rośnie wraz z dawką promieniowania jonizującego.

Układy NF-κB i p53 są ze sobą funkcjonalnie powiązane. W roku 2009 zapronowaliśmy pierwszy model wiążący oba systemy. Model ten pokazuje, że anty- i pro-apoptotyczne funkcje NF-κB zależą od kontekstu dynamicznego. Z analizy modelu wynika, że aktywacja modułu NF-κB przed uszkodzeniem DNA chroni komórki przed apoptozą, natomiast aktywacja NF-κB po naświetleniu zwiększa frakcję komórek apoptotycznych, praca **C9**. Oscylacje w układach NF-κB i p53 charakteryzują się zmienną amplitudą i dobrze zachowanym okresem oscylacji, niewrażliwym (między innymi) na zmianę liczby kopii genu. Okazuje się, że właściwość ta jest wyróżnikiem układów, w których oscylacje powstają przy przejściu przez superkrytyczną bifurkację Hopfa, praca **C10**. Wynik ten umożliwia weryfikację poprawności modeli układów dynamicznych opisujących stabilne oscylacje w komórkach.

Sygnalizacja w komórkach biologicznych, ma strukturę przestrzenną. W przypadku regulacji czynników transkrypcyjnych takich jak NF-κB, p53, IRF3 istotną rolę odgrywają translokacje białek pomiędzy jądrem a cytoplazmą. Translokacje te mogą być obserwowane pod mikroskopem w oparciu o fluorescencyjne znakowanie białek. Kinetyka czynników NF-κB i p53 jest na tyle wolna,

że proces może być analizowany w oparciu o modele dwukompartmentowe, w których zakłada się jednorodny rozkład gęstości czynników w obrębie jądra i cytoplazmy. Jednakże w szybkich procesach regulatorowych, takich jak transmisja sygnału, czy aktywacja receptorów na membranach komórek immunologicznych, założenie o jednorodnym rozkładzie substratów w kompartmentach nie jest spełnione. Jak pokazaliśmy w pracach **C11** i **C22,** w oparciu o analizę równań reakcji dyfuzji przestrzenny rozkład receptorów na membranie i wartość współczynnika dyfuzji decydują o aktywacji komórki. Eksperymenty pokazują, że aktywacja limfocytów typu B wymaga agregacji niewielkiej frakcji receptorów na membranie komórkowej - agregat receptorów może powstać na skutek wiązania poliwalencyjnych ligandów, badź kontrakcji fragmentu błony komórkowej limfocytu. Ostatnio zaproponowaliśmy model aktywacji limfocytów B, pokazujący, że powstanie niewielkiego agregatu receptorów prowadzi do lokalnej aktywacji receptorów, a następnie propagacji fali fosforylacji na całą membranę komórkową, praca **C13.**

Moje aktualne plany badawcze koncentrują się na analizie mechanizmów "podejmowania decyzji" w komórce. Zróżnicowane odpowiedzi komórek na stres wywołany patogenami, uszkodzeniem DNA czy szokiem termicznym są przykładami procesów decyzyjnych, zarówno na poziomie pojedynczych komórek, jak i tkanki. Intuicja podpowiada, że decyzje komórek wypracowywane są w bi i multistabilnych układach regulatorowych. Wydaje się również, że decyzje zapadają na pograniczu deterministycznego i stochastycznego przetwarzania informacji, a następnie realizowane w sposób bliski deterministycznemu wykorzystując liczebne białka efektorowe. Można zatem spodziewać się, że ilość molekuł reagujących w układach decyzyjnych jest stosunkowo mała - tak by umożliwić przeskoki pomiędzy basenami przyciągania stanów quasistacjonarnych. Z drugiej strony ilość ta nie może być zbyt mała, bo wtedy czas przebywania układu w pobliżu atraktora byłby zbyt krótki, by możliwe było zainicjowanie kaskady sygnałowej prowadzącej do białek efektorowych. Badanie mechanizmów podejmowania decyzji w odpowiedzi na stres jest obiecujące z punktu widzenia potencjalnych terapii - identyfikacja modułów decyzyjnych umożliwia modyfikację zachowania układu przy pomocy stosunkowo niewielkiej ilości leku, ograniczając skutki uboczne terapii.

Badania dotyczące odpowiedzi komórek na stres planuję prowadzić w oparciu o modelowanie matematyczne wspomagane przez eksperymenty w tworzonym laboratorium biologii molekularnej. Laboratorium, powstające dzięki finansowaniu przez CePT, będzie skoncentrowane na badaniu sygnalizacji w pojedynczych komórkach w oparciu o znaczniki fluorescencyjne z wykorzystaniem technik mikroprzepływowych.