

# Biologia systemów - analiza danych czasoprzestrzennych

Piotr Kupidura

28 kwietnia 2025

## 1 Wstęp

Poniższy raport przedstawia wyniki analizy danych czasoprzestrzennych z eksperymentu sygnalomicznego. W eksperymencie badano poziomy powiązanych z dwoma szlakami sygnałowymi: PI3K-AKT-mTOR i ERK-MAPK. Komórki wykorzystane w eksperymencie pochodziły z 5 linii - szczep dziki i mutacje  $AKT_{E17K}$ ,  $PIK_{E545K}$ ,  $PIK_{H1047R}$  i  $PTEN_{del}$ . Pomiary dokonywano co 5 minut i dotyczyły one: stosunku poziomów markerów obu szlaków w jądrze i cytoplazmie, jak i pozycji oraz rozmiaru jądra komórkowego. Celem tej pracy jest przeprowadzenie eksploracyjnej analizy tych danych i interpretacja jej wniosków w kontekście biologicznym.

## 2 Porównanie aktywności szlaków sygnałowych między mutacjami

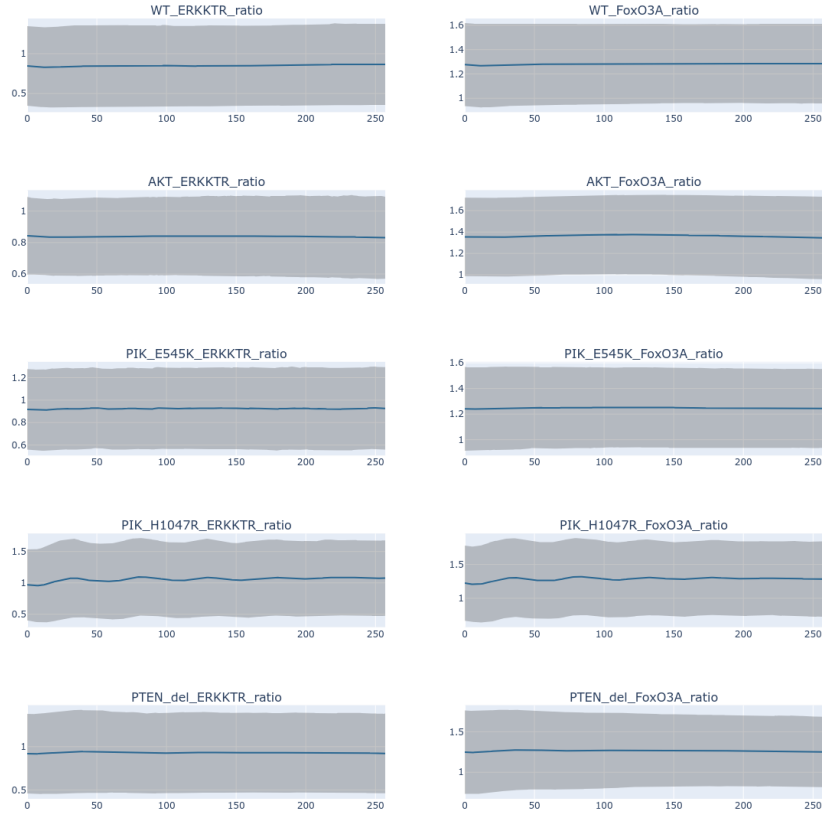
Z racji na zróżnicowanie profili mutacyjnych poszczególnych komórek możemy oczekiwać różnic w poziomach markerów. Na wykresach zobrazowano przebiegi czasowe poziomu obu markerów z podziałem na mutacje. rys.1 Pierwszym co rzuca się w oczy jest wysokie zróżnicowanie poziomu markerów w obrębie poszczególnych mutacji. Widzimy również, że w komórkach z mutacją  $PIK_{H1047R}$  poziomy obu markerów oscylują w czasie z kilkugodzinnym okresem. W przypadku  $ERK_{ratio}$  mutacja  $AKT_{E17K}$  ma podobny przebieg do szczepu dzikiego przy najniższym poziomie markera a  $PTEN_{del}$  podobny do  $PIK_{E545K}$  przy nieco wyższym poziomie. Najwyższy poziom występuje w mutacji  $PIK_{H1047R}$ . Z kolei dla  $FOXO3A_{ratio}$  wszystkie mutacje wykazują zbliżony poziom markera, z wyjątkiem,  $AKT_{E17K}$  gdzie jest on podwyższony. W celu potwierdzenia wniosków z analizy wizualnej przeprowadzono test Manna-Whitney'a z poprawką Bonferroniego dla średnich przebiegów między parami mutacji. rys.2 Jeśli przyjmiemy 0.05 jako próg istotności statystycznej to testy potwierdzają wcześniejsze wnioski - dla  $ERK_{ratio}$  mamy istotną różnicę dla wszystkich par oprócz  $AKT_{E17K} - WT$  i  $PTEN_{del} - PIK_{E545K}$  a dla  $FOXO3A_{ratio}$  istotne różnice występują jedynie pomiędzy  $AKT_{E17K}$  a pozostałymi mutacjami. Fakt, że

$AKT_{E17K}$  w obu przypadkach wyróżnia się na tle innych mutacji może wynikać z niezależnością jej wpływu na szlak AKT od czynników zewnętrznych. Zastanawiające są natomiast różnice w poziomie ERK pomiędzy mutacjami  $PIK_{E545K}$  i  $PIK_{H1047R}$  i fakt, że tylko w przypadku tej drugiej występują oscylacje, jako że obie mutacje dotyczą tego samego białka.

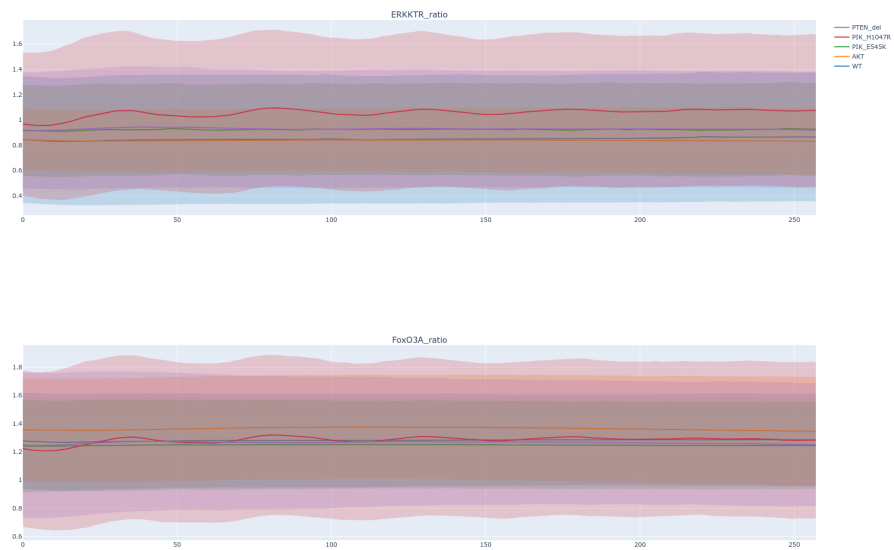
### 3 Analiza koordynacji przestrzennej i dynamiki sygnału

Mając na uwadze mechanizm chemiczny działania szlaków sygnałowych możemy przypuszczać, że mogłyby w pewnym zakresie działać również na poziomie międzykomórkowym. W takiej sytuacji spodziewalibyśmy się korelacji w rozmieszczeniu komórek, będących w danej chwili aktywnych sygnałowo. Przed przystąpieniem do analizy należy zdefiniować jaki warunek musi spełnić komórka, by została uznana za aktywną sygnałowo. W dalszych eksperymentach za aktywną uznamy komórkę, w której  $ERK_{ratio}$  przekracza 75 centyl. Takie podejście, o ile może wydawać się nadmiernym uproszczeniem, prowadzi do racjonalnych biologicznie wniosków, co okaże się w dalszej części raportu. Przy tak zdefiniowanej aktywności przeprowadzono następnie dwie analizy dotyczące struktury sąsiedztwa komórek - sprawdzono średnią odległość od najbliższej aktywnej komórki oraz liczbę aktywnych komórek w promieniu  $10\ \mu m$  w funkcji czasu z podziałem na mutacje rys.3 rys.4. Na wykresach widzimy oscylacje odpowiadające tym zaobserwowanym dla  $ERK_{ratio}$  w mutacji  $PIK_{H1047R}$ . Ponadto, oba przebiegi mają w obrębie mutacji podobny kształt a niski dystans odpowiada wysokiej liczbie sąsiadów. Widać również, że w sąsiedztwie komórek o mutacjach, dla których średnia wartość  $ERK_{ratio}$  była najwyższa znajduje się więcej komórek aktywnych. Jest to pierwsza przesłanka za istnieniem korelacji przestrzennej występowania aktywnych komórek. Na wykresie odległości można również zauważyć nieznaczny jej wzrost w ostatnich krokach czasowych. To z kolei jest związane ze spadkiem liczby komórek, przede wszystkim tych z mutacjami  $PIK_{E545A}$  i  $PIK_{H1047R}$  rys.7. Powyższe wyniki, choć obiecujące, nie pozwalają jednak jednoznacznie stwierdzić czy sąsiedztwo aktywnych komórek wpływa na aktywność szlaków. Żeby to zweryfikować przygotowano wizualizację położenia komórek na płaszczyźnie z podziałem na stany aktywacji. Widać na niej pewną zależność przestrzenną - komórki aktywują się raczej w sąsiedztwie innych komórek aktywnych rys.5. W celu znalezienia ściślejszego dowodu na to zjawisko przygotowano histogram przedstawiający rozkład poziomu  $ERK_{ratio}$  w sąsiedztwie komórek, które w danym kroku czasowym przekroczyły próg aktywacji i w pozostałych rys.6. Widać na nim wyraźnie, że wokół aktywujących się komórek poziom  $ERK_{ratio}$  jest średnio wyższy. Powyższe obserwacje zdają się potwierdzać hipotezę o korelacji przestrzennej poziomu markerów, natomiast bynajmniej nie wyczerpują one tematu. W analizach ograniczono się do obserwacji "statycznych" - w obrębie pojedynczych kroków czasowych. Dla lepszego zrozumienia międzykomórkowego przekazywania sygnałów warto byłoby wbo-

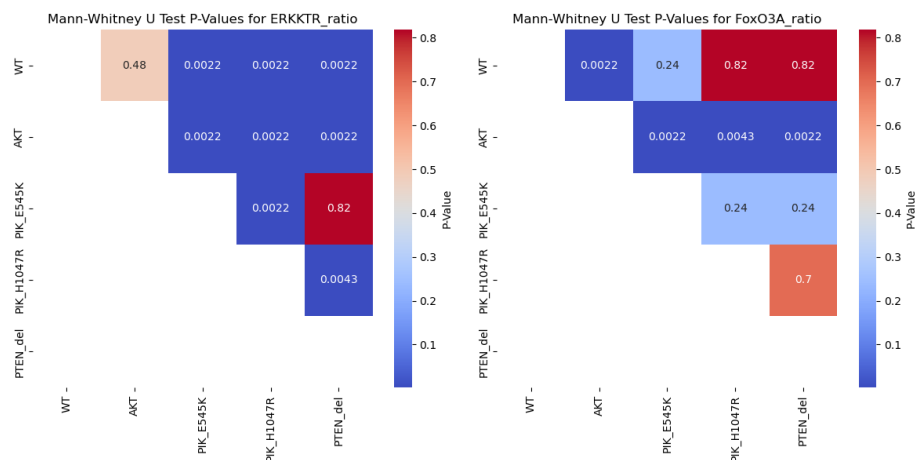
Mean and 95% Confidence Intervals for ERKKTR\_ratio and FoxO3A\_ratio by Mutation



Mean and 95% Confidence Intervals for ERKKTR\_ratio and FoxO3A\_ratio by Mutation



Rysunek 1: Średni poziom markerów dla poszczególnych mutacji z przedziałami ufności na poziomie 95%

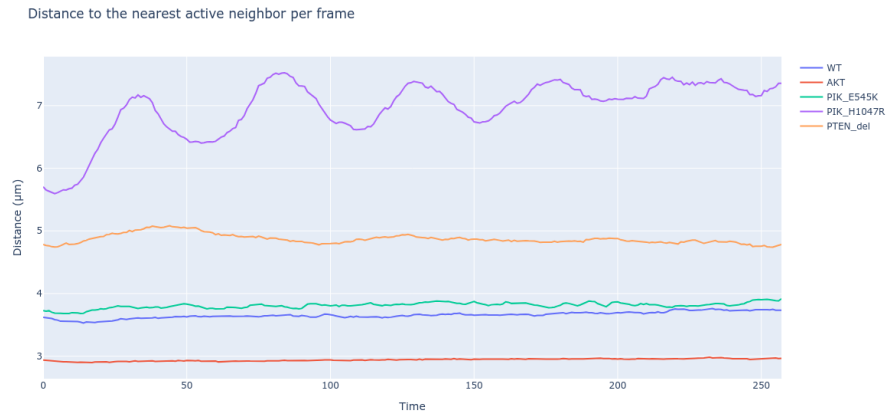


Rysunek 2: P-wartości testu Manna-Whitney’a dla poszczególnych par mutacji

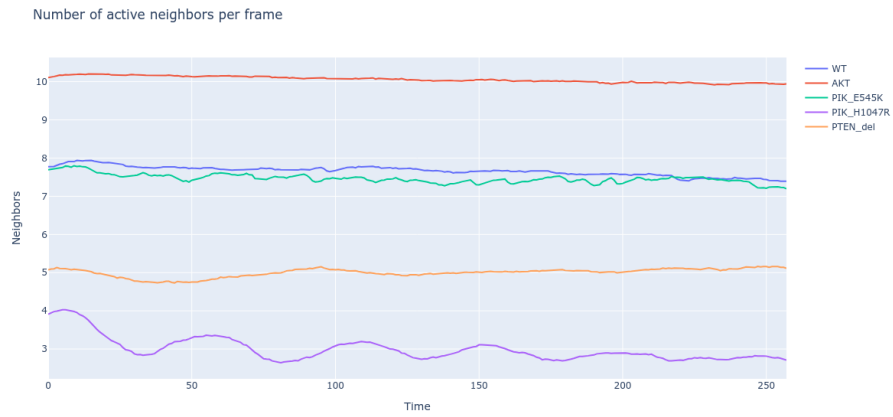
gacię analizy o element czasowy - chociażby zbadać stabilność powstających ognisk aktywności czy prędkość rozchodzenia się aktywacji.

## 4 Potwierdzenie istnienia oscylacji w komórkach z mutacją $PIK_{H1047R}$

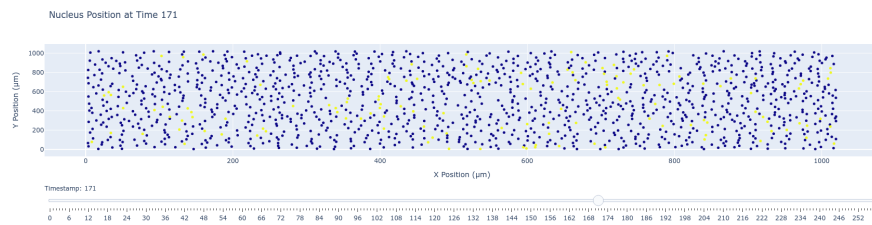
Jak zauważyliśmy wcześniej, poziomy markerów dla  $PIK_{H1047R}$  wykazują oscylacje. Do tej pory wnioskowaliśmy o tym jednak jedynie na podstawie uśrednionych przebiegów. W poniższej analizie spróbujemy wykazać istnienie tego zjawiska na poziomie pojedynczych komórek. W tym celu zastosowano test Kruskala-Wallisa. Test ten sprawdza, czy dane pochodzą z tego samego rozkładu. Jeśli cała seria czasowa pochodzi z jednego procesu np. mamy do czynienia ze space-rem losowym, to stosując test dla poszczególnych fragmentów spełniona będzie hipoteza zerowa. Jeśli natomiast mamy do czynienia z bardziej złożoną zależnością pomiędzy poszczególnymi obserwacjami (np. z periodycznością), to może to prowadzić do różnic w rozkładach a co za tym idzie odrzucenia hipotezy zerowej. Metoda stosowana do wykrywania okresowości wygląda następująco: najpierw z serii czasowej usuwany jest trend przy pomocy modelu liniowego. Następnie seria dzielona jest na fragmenty o długości z  $[45, 56]$  (przedział wybrano na podstawie obserwacji, że oscylacje w średnim przebiegu mają okres ok. 50 kroków czasowych) i dla każdej z nich przeprowadzany jest test Kruskala-Wallisa. Jeśli p-wartość któregośkolwiek z nich jest poniżej 0.05 przyjmujemy, że seria jest periodyczna. Tak opisana metoda jako periodyczne klasyfikuje około 15% wszystkich serii czasowych. Częstość poszczególnych mutacji w seriach periodycznych i aperiodycznych przedstawiono w formie histogramów. Widać, około 40% serii periodycznych stanowią serie odpowiadające mutacji  $PIK_{H1047R}$  co



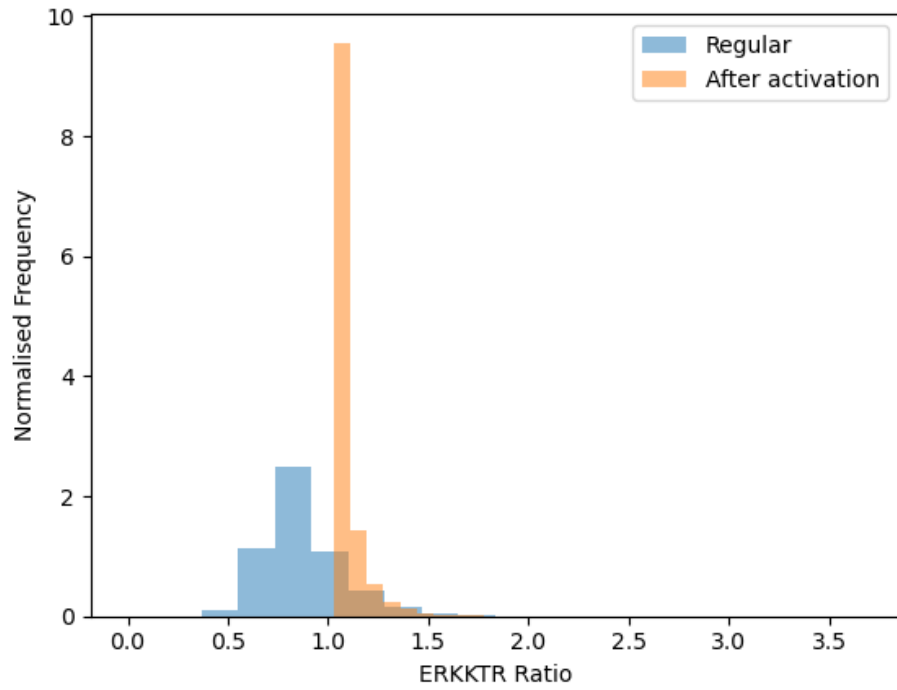
Rysunek 3: Odległość do najbliższego aktywnego sąsiada z podziałem na mutacje



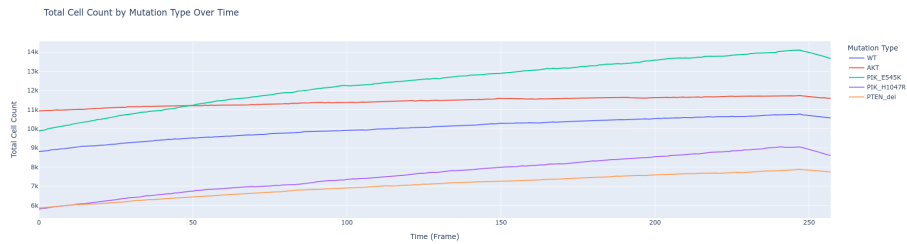
Rysunek 4: Liczba aktywnych sąsiadów w promieniu  $10\ \mu m$  z podziałem na mutacje



Rysunek 5: Aktywność komórek względem ich rozmieszczenia przestrzennego (żółte komórki są aktywne)



Rysunek 6: Histogram poziomu  $ERK_{ratio}$  sąsiadów komórki w zależności od tego, czy w danym kroku czasowym przekroczyła próg aktywacji

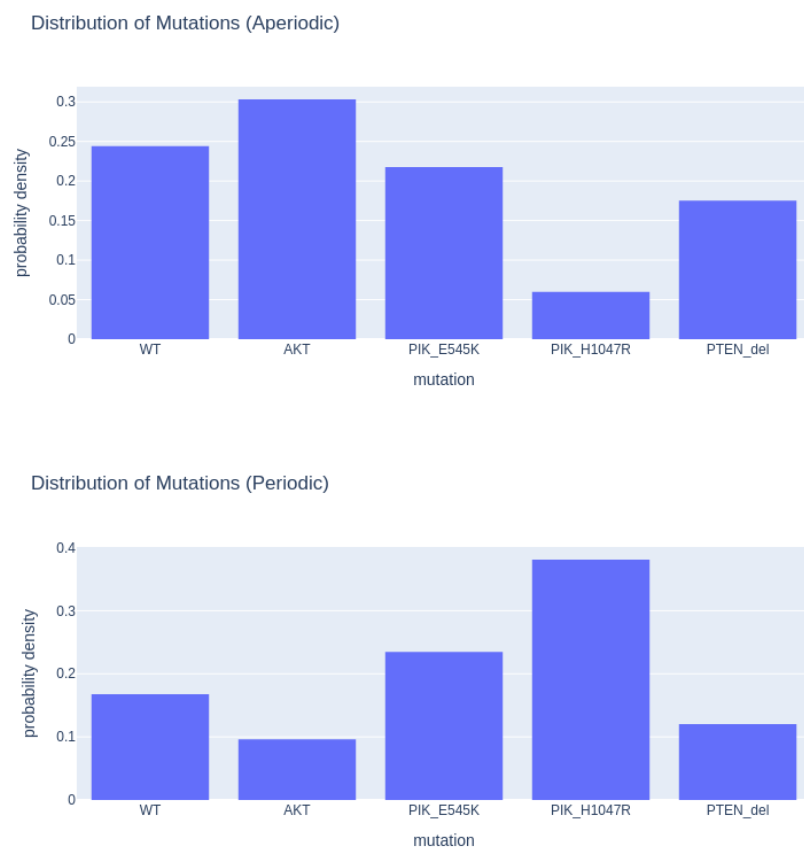


Rysunek 7: Liczba komórek o poszczególnych mutacjach w czasie

stanowi wyraźną nadreprezentację względem serii aperiodycznych rys.8. Na wizualizacji przykładowych serii czasowych zaklasyfikowanych jako periodyczne i aperiodyczne widać natomiast, że metoda ta nie jest idealna rys.9. Istotność różnic w rozkładach jest jedynie wskazówką i nie implikuje okresowości, a można wskazać przykład serii periodycznej, która zostanie zaklasyfikowana jako aperiodyczna (choćby seria  $\cos(at)$  przy okresie  $2\pi$ , jest ona w oczywisty sposób okresowa, natomiast test Kruskala-Wallisa nie da istotnego statystycznie wyniku, ponieważ grupy a co za tym idzie rangi będą identyczne). Dokładniejszą metodą wykrywania okresowości mogłaby być chociażby analiza widma fourierskiego serii. Istnienie oscylacji powiązanych z poziomem FoxO3 ma sens z punktu biologicznego - FoxO3 reguluje procesy związane z rytmem komórkowym [1]. Nie jest natomiast jasne, dlaczego pozostałe mutacje dotyczące szlaku AKT (przede wszystkim  $PIK_{E545A}$  dotyczące tego samego białka) nie wywołują podobnego efektu. Jedyną z powyższych obserwacji, która mogłaby tłumaczyć to zjawisko to wyższy średni poziom  $ERK_{ratio}$ . W literaturze brakuje niestety informacji o wpływie mutacji  $PIK_{H1047R}$  na dynamikę poziomu  $FoxO3A$ , więc nie jestem w stanie wyciągnąć dokładniejszych wniosków.

## 5 Podsumowanie

Powyższe analizy nie zbliżają się nawet do wyczerpania tematu, natomiast doprowadziły one do kilku ciekawych wniosków. Badane mutacje okazują się mieć istotny wpływ na aktywność sygnałową komórek, przy zaskakujących podobieństwach pomiędzy niektórymi z nich. Ponadto wykazano, że aktywność komórek jest skorelowana przestrzennie i istnieje zależność między aktywacją komórki a jej otoczeniem. Również samo otoczenie komórki może zależeć od typu mutacji. Udało się również, przy pomocy prostej metody statystycznej, potwierdzić występowanie oscylacji w komórkach z mutacją  $PIK_{H1047R}$ , natomiast ich mechanizm i znaczenie biologiczne pozostają tajemnicą.



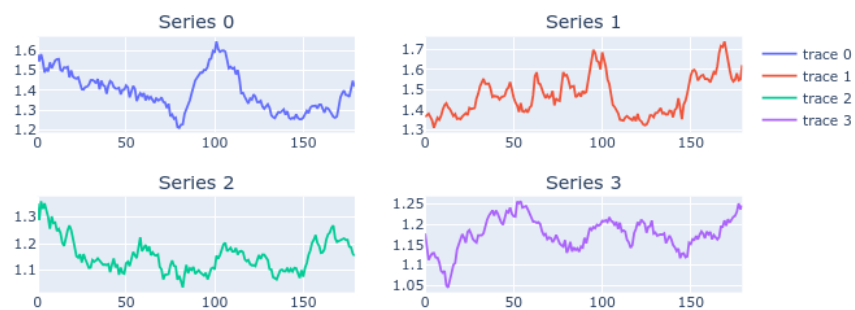
Rysunek 8: Histogram częstości mutacji dla szeregów periodycznych i aperiodycznych



### Aperiodic



### Periodic



Rysunek 9: Przykładowe serie zaklasyfikowane jako periodyczne i aperiodyczne. Metoda jest w stanie wykryć pewne trendy okresowe natomiast widać, że daleko jej do ideału