

# Sygnalomika, analiza danych czasoprzestrzennych

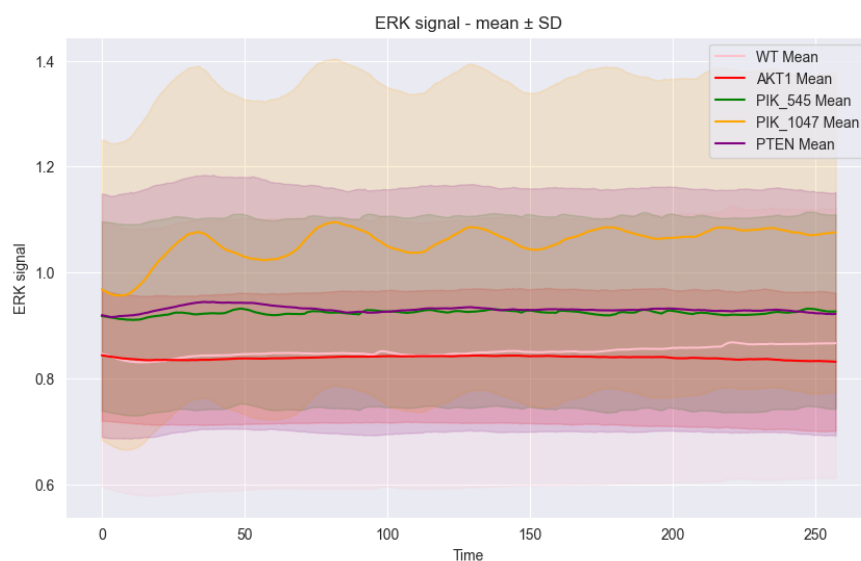
Anastazja Tasinkiewicz, 28.04.2025

## 1. Porównanie aktywności szlaków sygnałowych między mutacjami

### 1.1. Średnie przebiegi aktywności dla każdej mutacji w czasie

- **Sygnal ERK**

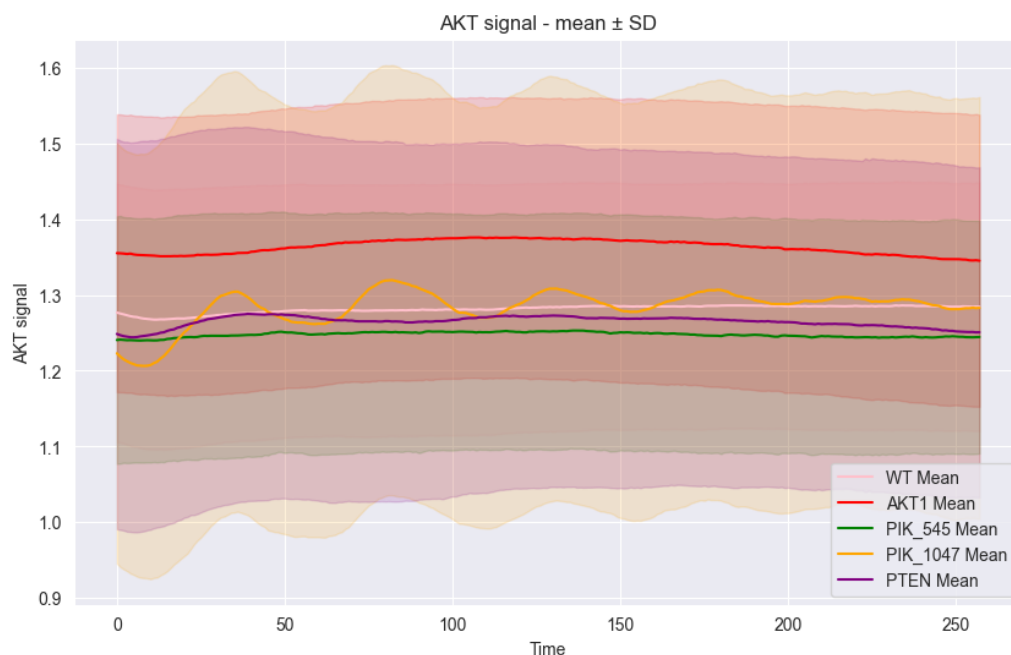
Średnie wartości sygnału ERK dla analizowanych fenotypów zawierają się w przedziale od około 0,8 do 1,2, przy czym skrajne wartości sięgają: minimum 0,6 dla WT i maksimum 1,4 dla fenotypu PIK\_1047. Najwyższą średnią aktywność ERK zaobserwowano dla komórek o fenotypie PIK\_1047. Od około 20. okna czasowego (100 minut) średni sygnał dla tej grupy utrzymuje się powyżej wartości 1,0, wykazując wyraźne oscylacje z czterema widocznymi pikami, które stopniowo wygładzają się i stabilizują po około 200. oknie czasowym (1000 minut). W przypadku pozostałych fenotypów trajektorie średniego sygnału są stosunkowo płaskie. Linie reprezentujące PIK\_545 i PTEN niemal całkowicie się pokrywają i znajdują się powyżej trajektorii WT i AKT1. Dla komórek PTEN obserwuje się pojedynczy pik w przedziale od 25. do 60. okna czasowego, natomiast dla komórek PIK\_545 w tym samym zakresie widoczne są dwa mniejsze piki. Linie dla WT i AKT1 również są blisko siebie, przy czym sygnał dla WT jest nieco wyższy niż dla AKT1. (Rys. 1)



**Rys. 1. Wykresy średnich przebiegów aktywności ERK wraz z przedziałami niepewności dla każdego fenotypu.** Różowy – WT, czerwony – AKT1, zielony – PIK 545, żółty – PIK 1047, fioletowy – PTEN. Na osi X zaznaczono czas (jedna jednostka odpowiada pięciu minutom), na osi Y siłę sygnału.

- **Sygnal AKT**

Średnie wartości sygnału AKT dla analizowanych fenotypów mieszczą się w przedziale od około 1,2 do 1,4, przy czym skrajne wartości wynoszą: 0,9 (minimum) i 1,6 (maksimum) dla fenotypu PIK\_1047. Najwyższą średnią aktywność AKT zaobserwowano w komórkach o fenotypie AKT1, w których sygnał utrzymuje się w zakresie 1,3–1,4. W tej grupie obserwuje się stopniowy wzrost wartości AKT od 25. okna czasowego, a następnie spadek od 125. okna. Średnie wartości sygnału dla pozostałych fenotypów są zbliżone i nakładają się na siebie. Dla PIK\_1047, podobnie jak w przypadku sygnału ERK, widoczne są wyraźne oscylacje — z czterema dobrze zaznaczonymi pikami w tych samych przedziałach czasowych — a następnie wypłaszczenie przebiegu. W komórkach PTEN początkowo rejestruje się wzrost średniego sygnału, który stabilizuje się po 60. oknie czasowym. Natomiast dla pozostałych typów komórek średni sygnał utrzymuje się na stabilnym poziomie przez cały okres obserwacji. Co ciekawe, średnia aktywność AKT nie okazała się najniższa dla komórek WT, a dla PIK\_545, mimo mutacji, która pobudza ten szlak. (Rys. 2)



**Rys. 2. Wykresy średnich przebiegów aktywności AKT wraz z przedziałami niepewności dla każdego fenotypu.** Różowy – WT, czerwony – AKT1, zielony – PIK 545, żółty – PIK 1047, fioletowy – PTEN.

Podsumowując, komórki z mutacją PIK\_1047 charakteryzują się najwyższą średnią aktywnością ERK, natomiast komórki z mutacją AKT1 osiągają najwyższy średni poziom sygnału AKT.

## 1.2. Analiza różnic w poziomach aktywności między WT a mutacjami.

Przeprowadzono testy istotności statystycznej – Manna-Whitneya, stosując dwustronną alternatywę hipotezy. Porównywano poziomy aktywności między komórkami WT a każdą z mutacji od 60 do 180 minuty. Ze względu na testowanie wielu hipotez zastosowano korektę Bonferroniego. Wyniki zostały przedstawione w Tabeli 1A i 1B.

W przypadku sygnału ERK różnicę istotną statystycznie w poziomach aktywności stwierdzono między komórkami WT a PIK\_545, PIK\_1047 oraz PTEN. Natomiast dla AKT między WT a AKT1, PIK\_545 oraz PTEN.

**Tabela 1A. Wyniki testów Manna-Whitneya dla sygnału ERK.**

<b>Mutation</b>	<b>Statistic_ERK</b>	<b>P_value_ERK</b>	<b>Bonferroni_ERK</b>
AKT1	319.0	0.9073219836857066	1.0
PIK_545	0.0	1.4156562248495535e-09	5.662624899398214e-09
PIK_1047	0.0	1.4156562248495535e-09	5.662624899398214e-09
PTEN	0.0	1.4156562248495535e-09	5.662624899398214e-09

**Tabela 1B. Wyniki testów Manna-Whitneya dla sygnału AKT.**

<b>Mutation</b>	<b>Statistic_ERK</b>	<b>P_value_ERK</b>	<b>Bonferroni_ERK</b>
AKT1	0.0	1.4156562248495535e-09	5.662624899398214e-09
PIK_545	625.0	1.4156562248495535e-09	5.662624899398214e-09
PIK_1047	327.0	0.7858989168050492	1.0
PTEN	499.0	0.0003074624328962446	0.0012298497315849785

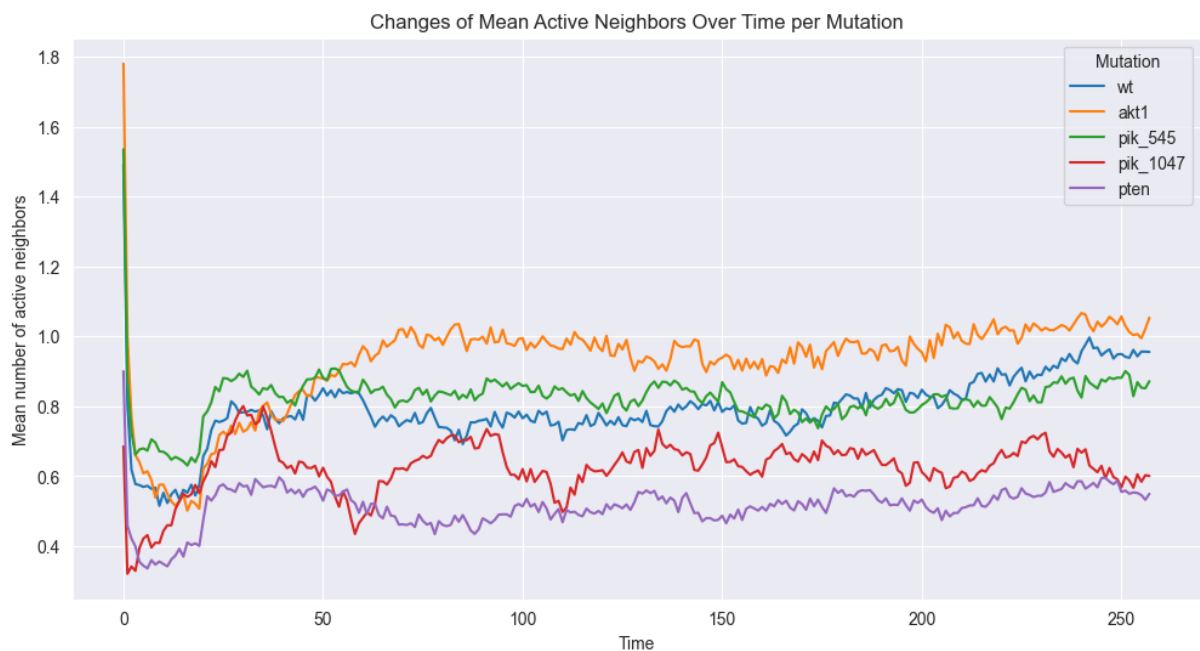
## 2. Analiza koordynacji przestrzennej i dynamiki sygnału AKT

### 2.1. Zdefiniowanie aktywnego stanu komórki

W celu identyfikacji przedziałów czasowych, w których dana komórka wykazywała wysoką aktywność AKT w porównaniu do otoczenia, zaimplementowano funkcję, która dla każdej komórki wyznacza próg aktywności — określony jako 80. percentyl sygnału AKT. Następnie, wykorzystując przesuwające się okno, funkcja oblicza lokalne maksima. Za aktywne uznaje się te komórki, których poziom sygnału AKT przekracza wyznaczony próg i jednocześnie znajduje się w lokalnym maksimum.

## 2.2. Zmiana średniej liczby aktywnych sąsiadów w czasie

Zmiany średniej liczby aktywnych sąsiadów w czasie dla wszystkich badanych fenotypów przedstawiono na rysunku 3. We wszystkich grupach komórek najbardziej gwałtowny wzrost obserwuje się w przedziale od 1. do 30. okna czasowego. Następnie, dla wszystkich fenotypów poza PIK\_1047, zmiany stają się mniejsze i przebiegają wolniej. W przypadku PIK\_1047 widoczne są dwa wyraźne piki w przedziałach 20–60 oraz 60–110 okien czasowych. Później dynamika zmian jest mniej intensywna. Dla komórek WT oraz PIK\_545 od około 200. okna czasowego obserwuje się ponowny wzrost średniej liczby aktywnych sąsiadów. Najwyższy wzrost średniej liczby sąsiadów, który utrzymuje się przez cały okres obserwacji występuje dla komórek AKT1. Natomiast najniższy dla fenotypu PTEN.



**Rys. 3.** Wykresy zmiany średniej liczby aktywnych sąsiadów w czasie dla poszczególnych fenotypów komórek.

W celu sprawdzenia czy średnia liczba aktywnych sąsiadów zależy od fenotypu komórki, przeprowadzono test Kruskala-Wallisa. Statystyka testu wyniosła 10152 a p-value 0, co wskazuje, że istnieje istotna różnica w średniej liczbie aktywnych sąsiadów między analizowanymi grupami.

Podsumowując, systemy komórkowe utrzymują względnie stabilny poziom średniej liczby aktywnych sąsiadów, którego wartość jest zależna od fenotypu komórek.

### 2.3. Charakter aktywności sygnałowej i jej rozprzestrzenianie.

Aktywność sygnałowa ma charakter lokalny i może rozprzestrzeniać się w sposób skoordynowany w czasie i przestrzeni.

W wizualizacji zmieniającej się aktywności dla mutacji PIK\_1047, zaobserwowano „przesuwającą się falę” sygnału AKT przez kolejne warstwy komórek rozpoczynając od dołu (start ok. 190. okno czasowe). Co przedstawia skoordynowany sposób rozprzestrzeniania się sygnału. W tej samej animacji, na brzegach w początkowych oknach czasowych można dostrzec regiony w obrębie, których aktywują się komórki, ale sygnał wygasa, nie przechodzi dalej, co z kolei przemawia za lokalnym charakterem sygnału.

### 3. Czy liczba sąsiadujących komórek w momencie aktywacji różni się między komórkami o różnych mutacjach?

Badane mutacje prowadzą do zwiększonej aktywności szlaku sygnałowego AKT. Ponieważ komórki o analizowanych fenotypach wykazują zróżnicowaną wrażliwość na bodźce z otoczenia, zdecydowano się sprawdzić, czy zmiany w szlaku AKT skutkują aktywacją komórek przy istotnie różnych lokalnych zagęszczeniach w porównaniu do komórek typu dzikiego (WT).

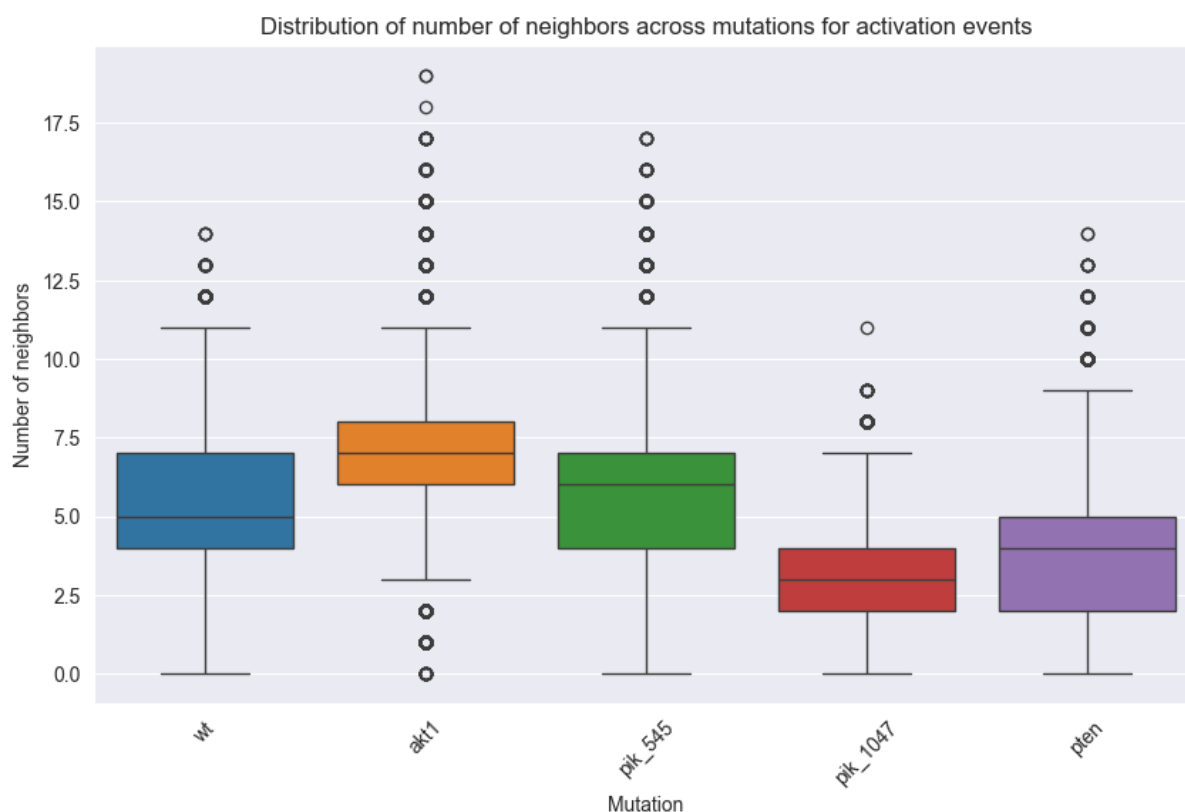
W tym celu zidentyfikowano momenty aktywacji komórek (czas  $t$ ) i określono liczbę sąsiadów w chwili poprzedzającej aktywację ( $t-1$ ). Następnie przeprowadzono test Kruskala-Wallisa w celu oceny zależności liczby sąsiadów w momencie aktywacji od typu mutacji. Statystyka testu wyniosła 368434, a wartość  $p$  była równa 0, co wskazuje na istotne statystycznie różnice pomiędzy analizowanymi fenotypami. W celu określenia, między którymi grupami występują różnice, wykonano dodatkowo test post hoc DUNN-a. Wyniki analizy (Tabela 2) wykazały, że różnice są istotne między wszystkimi badanymi grupami.

Tabela 2. Wynik testu post hoc Dunn'a.

	AKT1	PIK_1047	PIK_545	PTEN	WT
AKT1	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0
PIK_1047	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
PIK_545	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
PTEN	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0
WT	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0

Dodatkowo po uszeregowaniu mutacji według średniej liczby sąsiadów (rosnąco: pik\_1047, pten, wt, pik545, akt1) w trakcie aktywacji obliczono współczynnik korelacji Spearmana, który wyniósł 0,605 przy wartości p równej 0, co wskazuje na istotną statystycznie dodatnią zależność pomiędzy liczbą sąsiadów aktywujących się komórek a ich fenotypem.

Liczbę sąsiadów komórki w momencie aktywacji dla pięciu fenotypów zwizualizowano za pomocą wykresów pudełkowych (rys. 4). Mediany są zgodne z uszeregowaniem przyjętym do policzenia korelacji Spearmana.



Rys. 4. Wykresy pudełkowe liczby sąsiadów komórki w momencie aktywacji dla pięciu fenotypów.

Wyniki wskazują, że jedynie komórki z grupy AKT1 aktywują się przy wyższych lokalnych zagęszczeniach w porównaniu do grupy WT. Jest to zgodne z oczekiwaniami, ponieważ mutacja AKT1 prowadzi do konstytutywnej aktywacji białka AKT1, niezależnie od bodźców zewnętrznych.

W przypadku grupy PIK\_545 kwartyle 1. i 3. są zbliżone do WT, jednak mediana jest wyższa w grupie PIK\_545. Może to sugerować, że mutacja ta nie powoduje drastycznej zmiany w czułości na bodźce zewnętrzne, lecz prowadzi do subtelnych różnic w aktywacji komórek. Z kolei w grupach PIK\_1047 oraz PTEN, w których aktywacja następuje przy niższych

lokalnych zagęszczeniach niż w WT, obserwowane wyniki mogą wskazywać na zwiększoną wrażliwość komórek na sygnały z mikrośrodowiska.

Podsumowując, analiza potwierdza istnienie zależności między lokalnym zagęszczeniem komórek w momencie ich aktywacji a ich fenotypem. Wyniki te sugerują, że zmiany w szlaku PI3K/AKT istotnie wpływają na sposób, w jaki komórki odbierają i reagują na bodźce z otoczenia.