

ANALIZA BOOLEANE E GJËNDJEVE TË QËNDRUESHME TË NJË SISTEMI BIOLOGJIK

*INVA KOÇIAJ¹, MALVINA MARKU²

¹Kolegji Jopublik “Mehmet Akif”, Tiranë

²Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Departamenti i Fizikës

e-mail: inva.kociaj@gmail.com

Përmbledhje

Rëndësia e madhe që po merr vazhdimisht studimi i sistemeve biologjike, ka çuar në përmirësimin e metodave studimore ekzistuese por edhe në kërkimin e metodave të reja teorike. Në këtë punim, ne prezantojmë përdorimin e modelit Boolean për studimin dinamik të evoluimit të një sistemi biologjik rregullator. Në fokus është kompleksi mTORC1, për shkak të ndikimit të madh që ka kjo proteinë në disa procese metabolike dhe në sëmundje tumorale. Qëllimi modelimit është gjetja e pikave fikse të sistemit sepse nëpërmjet tyre analizohen gjendjet e qëndrueshme të mundshme që ky sistem mund të arrijë. Këtu, përftohen 16 pika fikse por, vetëm një pjesë e tyre i përshtaten nevojave të sistemit tonë. Qëllimi final i studimit është analiza që kryhet për të përzgjedhur ato pika fikse që i përshtaten më mirë kushteve të një sistemi, duke përjashtuar pjesën tjetër.

Fjalëkyçe: Modelim Boolean, metoda sinkrone/asinkrone, nyje, rrjetë, evoluim dinamik, proteinë kinase.

Abstract

The study of biological systems is constantly attracting a very big attention among scientists and this has led to the improvement of the existing methodology of study and also to the search for new theoretical methods. In this paper, we present the use of the Boolean model for the dynamic study of the evolution of a biological regulatory system. The focus is on the mTORC1 complex, due to the great influence that this protein has on some metabolic processes and in tumor diseases. The final goal of the modelling is to find the fixed points of the system because the possible stable states that this system can achieve are analyzed through them. Here, we achieve 16 fixed points, but just a part of them fits the needs of our system. Our ultimate goal is thw analysis followed to select those fixed points that best suit the conditions of one system, excluding the rest.

Key words: Boolean model, synchronous/asynchronous update, nodes, network, dynamical evolution, protein kinase.

Hyrje

Sistemet biologjike të bashkëveprimit proteinë–proteinë, apo të transmetimit të sinjalit, kanë një natyrë shumë komplekse, pasi një studim i plotë i tyre kërkon njohjen njëherazi të shumë faktorëve, (Cohen & Havlin, 2006) që ndërveprojnë me njëri-tjetrin në mënyrë interaktive dhe të vazhdueshme. Për shkak se kemi të bëjmë me bashkëveprime në nivel molekular dhe qelizor, kryerja e eksperimenteve dhe marrja e të dhënave eksperimentale nuk është

gjithnjë e lehtë për t'u realizuar. Për këtë arsye, shpesh nevojitet që studimi dinamik i këtyre sistemeve të bëhet në mënyrë teorike dhe numerike (Saadatpour & Albert, 2016; Kauffman, 2004).

Në fokus të këtij punimi është studimi teorik i dinamikës së proteinës kinase mTOR (mammalian target of rapamycin), që është një rregullator kryesor i rritjes dhe ndarjes së qelizave. Kjo proteinë i përgjigjet një shumëllojshmëri stimuljsh si stresi, energjia, lëndët ushqyese dhe faktorët e rritjes (Sengupta *et al.* 2010). Nga ana tjetër, mTOR ndikon në shumë sëmundje, veçanërisht në ato tumorale (Zoncu *et al.* 2011). Ajo formon dy komplekse të ndryshme proteinike mTORC1 dhe mTORC2, që kanë funksione dhe elementë përbërës të ndryshëm. Me gjithë studimet e shumta të zhvilluara deri më sot, rreth kompleksit mTORC2 ka ende mungesë të informacioneve eksperimentale, rreth efekteve që ky kompleks mund të ketë në një rrjet të caktuar (Efeyan & Sabatini, 2010). Nga ana tjetër, mTORC1 është një kompleks proteinik i mirë njohur si nga ana strukturore ashtu dhe ajo funksionale, dhe rëndësia që ajo ka i ka shtyrë shkencëtarët për të hetuar më shumë rreth tij (Yip *et al.* 2010; Loewith *et al.* 2002).

Një rëndësi e tillë e proteinës mTOR, dhe më konkretisht e kompleksit të saj mTORC1, përbën një arsye mjaft të fortë që sisteme të tilla, ku kjo proteinë bën pjesë, të studiohen jo vetëm eksperimentalisht por edhe teorikisht. Ndaj, në këtë punim, ne prezantojmë përdorimin e modelit Boolean për studimin e evolucionit dinamik të sistemit të transmetimit e sinjalit të proteinës mTOR. Ky është një model matematikor diskret që jep një përshkrim cilësor të sistemit biologjik, të përfaqësuar nga një rrjet i ndërtuar nga *nyjet*, që përfaqësojnë çdo element të sistemit, dhe nga *linqet*, që përfaqësojnë lidhjet midis këtyre nyjeve (Saadatpour & Albert, 2013; Helikar *et al.* 2011; Abou-Jaoude *et al.* 2016).

Dinamika e ndryshimit të gjendjeve bëhet me metodën sinkrone dhe asinkrone. Qëllimi kryesor është përcaktimi i pikave fikse të sistemit. Më tej vazhdohet me analizimin e gjendjeve të qëndrueshme të sistemit në përgjithësi dhe gjendjet e çdo elementi të rrjetit në veçanti. Pika fikse është një koncept matematikor por gjetja dhe analiza e saj për një sistem biologjik mund të jetë me mjaft interes për t'u ditur, pasi kështu mund të analizohet çdo gjendje e mundshme e qëndrueshme e sistemit në shqyrtim. Nga të gjitha gjendjet e qëndrueshme që gjeneron modeli i sistemit biologjik veçohen vetëm ato gjendje që përputhen me kushtet specifike biologjike në të cilat ndodhet sistemi. Ne mendojmë se kjo përzgjedhje ndihmon në njohjen e dinamikës së sistemit. Kështu, kërkuesit shkencor përftojnë një të dhënë më shumë për të hulumtuar më tej rreth metodave eksperimentale që nevojiten për përmirësimin e sjelljes së sistemeve biologjike, në varësi të kushteve specifike.

Ndryshimi i gjendjeve të nyjeve me anë të modelit Boolean

Modeli Boolean është një model diskret që na ndihmon për të ndërtuar një rrjet, ku çdo element i tij përfaqësohet nga një *nyje* (node) ndërsa

bashkëveprimet midis elementëve (nyjeve) përfaqësohen nga *lidhjet* (links), që lidhin nyjet me njëra-tjetrën (Saadatpour & Albert, 2013; Abou-Jaoude *et al.* 2016). Nyjet e rrjetit mund të marrin vetëm dy vlera të mundshme të përcaktuara: **1 (ON)** që i takon një gjendje aktive të nyjes, ose **0 (OFF)**, që i takon një gjendje jo-aktive të nyjes. Në një çast të caktuar të kohës t çdo nyje mund të ndodhet në një dhe vetëm një gjendje, qoftë kjo aktive ose jo-aktive. Me kalimin e kohës, gjendja e çdo nyje ndryshon në bazë të informacionit që elementët përcjellin tek njëri-tjetri.

Evoluimi i gjendjeve mund të bëhet me anë të metodës sinkrone, ku gjendjet e të gjitha nyjeve ndryshojnë njëkohësisht dhe në përputhje të plotë me njëra-tjetrën, ose me anë të metodës asinkrone (jo-sinkrone), ku elementët e rrjetit ndryshojnë gjendje në mënyrë të ç'rregullt. Në çdo rast dhe metodë gjendja pasardhëse e secilës nyje, në çastin e kohës $t + 1$, do të përcaktohet përmes disa funksioneve logjike që zbatohen në gjendjen aktuale ku ndodhet nyja në çastin e kohës t . Këto funksione logjike, të njohura si funksione Booleane, shprehen nga operatorët logjikë si **AND** (DHE), **OR** (OSE) dhe **NOT** (NUK). Përdorimi i këtyre operatorëve varet shumë nga roli i secilit element mbi elementët e tjerë, ashtu si edhe nga numri i elementëve që ndikojnë mbi të njëjtin element në të njëjtin çast të kohës t .

Modelimi Boolean i bazuar në përditësismin e gjendjeve binare të çdo nyje, bën që numri i gjendjeve binare nëpër të cilat sistemi do të evoluojë me kohën është i barabartë me 2^N ; ku N - paraqet numrin e nyjeve të rrjetit. Në rastin kur rrjeti është shumë të madh, ai mund të reduktohet në bazë të disa supozimeve të bëra në përputhje edhe me modelin Boolean (Nikolajewa *et al.* 2007; Chen *et al.* 2000; Helikar *et al.* 2011), zbatimi i të cilave ndikon vetëm në thjeshtësimin e modelimit dhe jo në rezultatet që përftohen.

Analiza Booleane e sistemit rregullator të proteinës mTOR

Analiza Booleane e një sistemi biologjik mundëson studimin dinamik të sistemit dhe çon në përcaktimin e pikave fikse të tij (Radde, 2012; Taou *et al.* 2018). Identifikimi i këtyre pikave fikse na mundëson të njohim gjendjet e mundshme të qëndrueshme të sistemit si edhe të kuptojmë nëse elementët janë në gjendje aktive apo jo-aktive. Rrjeti në shqyrtim është sistemi biologjik i transmetimit të sinjalit të proteinës mTOR, origjinali i të cilit paraqitet në (Efeyan & Sabatini, 2010). Ky është një rrjet relativisht i vogël, i rindërtuar dhe prezantuar në (Kociaj, 2021), ku mënyra dhe modelimi kryhet vetëm për një kusht fillestar specifik.

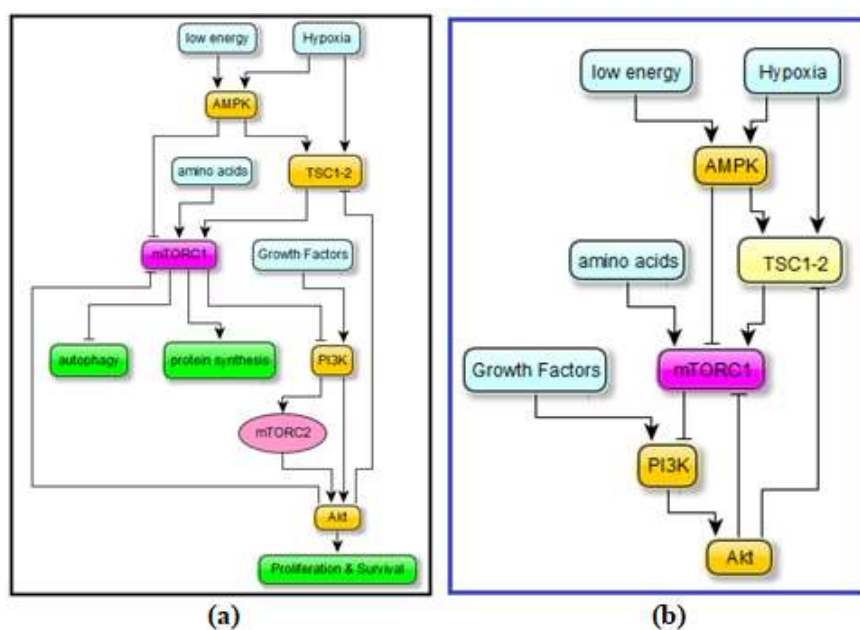


Figura 1: Rrjet i transmetimit të sinjalit të proteinës kinase mTOR, nëpërmjet dy komplekseve të saj proteinike mTORC1 dhe mTORC2. Figura majtas (a) paraqet rrjetin e plotë të përbërë nga 13 nyje, ndërsa figura djathtas (b) paraqet rrjetin e reduktuar të përbërë nga 9 nyjet për të cilat zbatohen funksionet Booleane.

Pasi analizohet roli i çdo elementi në rrjet, procesi i reduktimit më tej bëhet në mënyrë të tillë që transmetimi i sinjalit nuk ndërpritet (Figura 1. b). Katër prej elementeve të rrjetit; “low energy” (energji e ulët), “hypoxia” (hipoxia), “amino acids” (aminoacidet) dhe “growth factors” (faktorët rritës), konsiderohen si porta hyrëse përmes të cilave hyn informacioni gjenetik, ndërsa tre elementët e tjerë: “autophagy” (autofagia), “protein synthesis” (sinteza e proteinave) dhe “proliferation & survival” (prolifimeri dhe elementët për mbijetesë) konsiderohen si porta dalëse, përmes të cilave informacioni përcillet drejt qelizave dhe elementëve të tjerë qelizorë të jashtëm.

Duke vazhduar më tej, për çdo element të rrjetit (Figura 1.b), funksioni Boolean korrespondues shkruhet në bazë të bashkëveprimeve që ekzistojnë midis elementëve, të vërtetuara eksperimentalisht. Në rast se të dhëna të tilla mungojnë, funksionet Booleane shkruhen në bazë të disa supozimeve logjike e të thjeshta:

- Kur gjendja e një elementi rregullohet njëkohësisht nga veprimi i pavarur i dy elementëve të tjerë, operatori logjik **AND** përdoret.
- Kur veprimi i vetëm njëres prej të gjitha nyjeve, që ndikojnë për rregullimin e funksionit të një nyje specifike, është i mjaftueshëm, atëherë përdoret operatori **OR**.

- Operatori **NOT** përdoret në rastet kur një nyje e rrjetës rregullohet nga një element frenues (jo-nxitës apo jo-aktivizues) (Thomas, 1973; Albert & Othmer, 2003; Espinosa-Soto *et al.* 2004).

Rezultate dhe diskutime

Reduktimi i rrjetit dhe shkrimi i funksioneve Booleane është pjesa më e rëndësishme e modelimit Boolean, pasi prej tyre varen rezultatet dhe analiza e mëtejshme. Me qëllim përcaktimin e pikave fikse të sistemit, pra gjendjeve të qëndrueshme të tij, modeli Boolean i ndërtuar simulohet me anë të BooleanNet (Albert *et al.* 2008; Cha & Lee, 2020), i bazuar në gjuhën Python. Duke qenë se pikat fikse janë invariante ndaj kohës, atëherë numri dhe lloji i tyre është i njëjtë për të dy metodat e përdorura (Tabela 1. b).

(a)		(b)
Nyjet	Rregullat Booleane	Pikat Fikse
Low energy	low energy* = low energy	00000010
Hypoxia	hypoxia* = hypoxia	111010011
Amino Acids	amino acids* = amino acids	011000011
Growth Factors	growth factors* = growth factor	100000010
AMPK	AMPK* = low energy AND hypoxia	110010010
PI3K	PI3K* = growth factor AND (NOT mTORC1)	010000010 000101100
AKT	AKT* = PI3K	011100011
TSC1/2	TSC1/2* = AMPK OR hypoxia OR (NOT AKT)	111110011 101100011
mTORC1	mTORC1* = amino acids AND ((NOT AKT) OR (NOT AMPK) OR TSC1/2)	001000011 001100011 100101100 101000011 010101110 110111110

Tabela 1: Tabela në të majtë (a) tregon funksionet Booleane për çdo nyje të rrjetit të reduktuar, ndërsa në tabelën në të djathtë (b) jepet paraqitja binare e 16 pikave fikse të përfuara nga simulimi sinkron dhe asinkron i rrjetit Boolean. Çdo numër binar (0 dhe 1) i takon gjendjes përfundimtare që arrin çdo element biologjik dhe renditja e tyre lidhet me renditjen e elementëve sipas tabelës në të majtë, pra low energy (energji e ulët), hypoxia (hipoksia), amino_acids, growth_factors (faktorët e rritjes), AMPK, PI3K, Akt, TSC1/2, mTORC1.

Për të dy metodat simuluese të përdorura, sinkrone dhe asinkrone, paraqitja grafike e tyre jepet në Figurën 2 (metoda sinkrone) dhe në Figurën 3 (metoda asinkrone). Në këto figura tregohen grafet e 16 tërheqësave (pikave fikse) të rrjetit të paraqitur në Figurën 1.b,

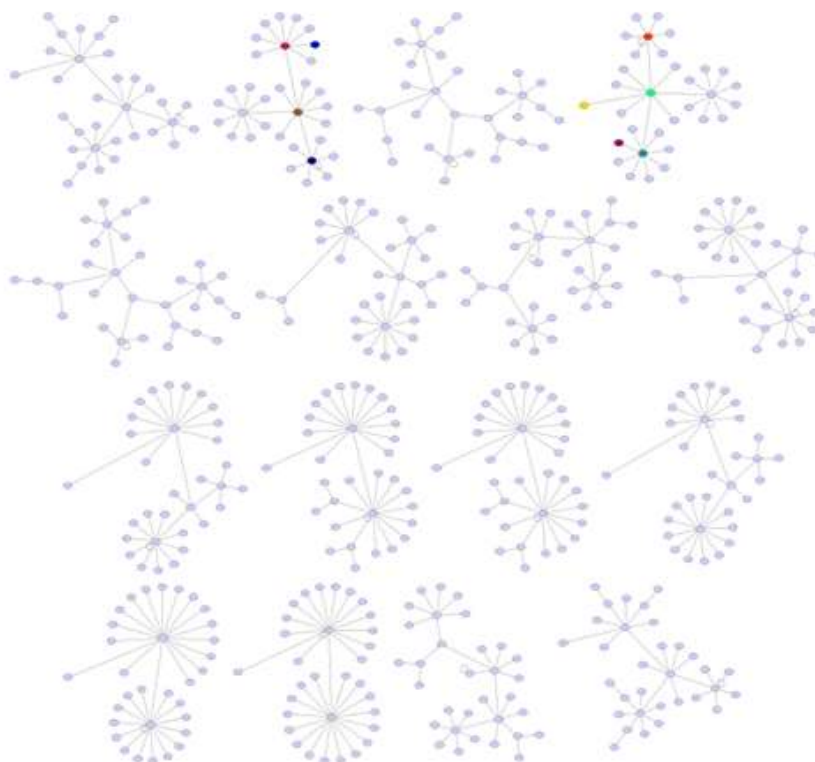


Figura 2: Grafet e gjendjeve tranzitore të modelit Boolean sinkron. Janë simuluar gjithsej 512 gjendje që lidhen mes tyre nëpërmjet 512 lidhjeve. Çdo lidhje nënkupton një kalim tranzitor, tipike e metodës sinkrone. Vihen re gjithashtu edhe 16 laqe vetjake.

Çdo pikë fikse konsiderohet si tërheqësi kryesor dhe është pjesë e një baseni specifik, të përbërë nga disa gjendje tranzitore nëpër të cilat kalon sistemi. Një basen konsiderohet një bashkësi gjendjesh tranzitore që përfundojnë në një pikë (gjendje) të fundme, të vetme. Vlen të theksohet se numri i gjendjeve që përbëjnë çdo basen është i ndryshëm pasi sistemit mund ti duhet më shumë kohë të arrijë një gjendje sesa një tjetër.

Dinamika e sistemit sipas metodës sinkrone na tregon se numri i gjendjeve të gjeneruara është i njëjtë me numrin e lidhjeve midis nyjeve (Figura 2). Kjo do të thotë se një nyje e ndodhur në një gjendje të caktuar në çastin e kohës t mundet të shkojë, në çastin e kohës $t + 1$, vetëm drejt një gjendje tjetër (të

vetme). Ndërsa në metodën asinkrone vihen re më shumë lidhje sesa numri i nyjeve (Figura 3), ndërkohë që numri i gjendjeve por edhe numri i laqeve të përfuara mbetet i njëjtë.

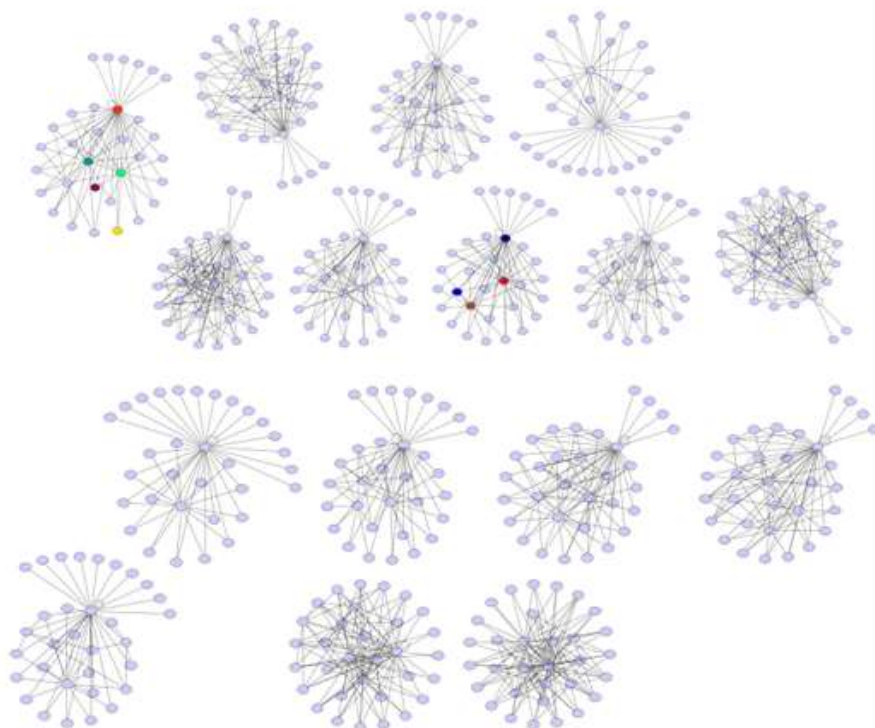


Figura 3: Grafet e gjendjeve tranzitore të modelit Boolean asinkron të evoluimit dhe kalimit tranzitor të çdo nyje nga një gjendje në një tjetër, deri në mbërritjen finale të tyre kur arrijnë gjendjen stabil të prezantuar nga pikat fikse. Janë simuluar gjithsej 512 gjendje që lidhen mes tyre nëpërmjet 1375 lidhjeve. Vihen re gjithashtu edhe 16 laqe vetjake.

Prania e më shumë linqeve të gjeneruara me metodën asinkrone, më shumë se 2-fishi i numrit të nyjeve, lidhet pikërisht me faktin se përditësimi i gjendjeve dhe evoluimi i sistemit nga një gjendje tranzitore në një tjetër nuk ndodh njëkohësisht. Kjo metodë mundëson kalimin e një gjendje drejt dy apo më shumë gjendjeve të tjera njëkohësisht. Megjithatë, pas një kohe të caktuar, të dyja metodat mundësojnë që sistemi të arrijë të njejtat gjendje të qëndrueshme (pikat fikse).

Pamja e një baseni tërheqësish, i përftuar me të dy metodat dhe i parë më nga detaje ka një paraqitje grafike si ajo në Figurën 4. Nyja në ngjyrë të kuqe tregon gjendjen finale të sistemit, pra një nga gjendjet e qëndrueshme për këtë sistem. Të tillë pamje kanë të gjitha basenet e paraqitura grafikisht në Figurat 2 dhe 3.

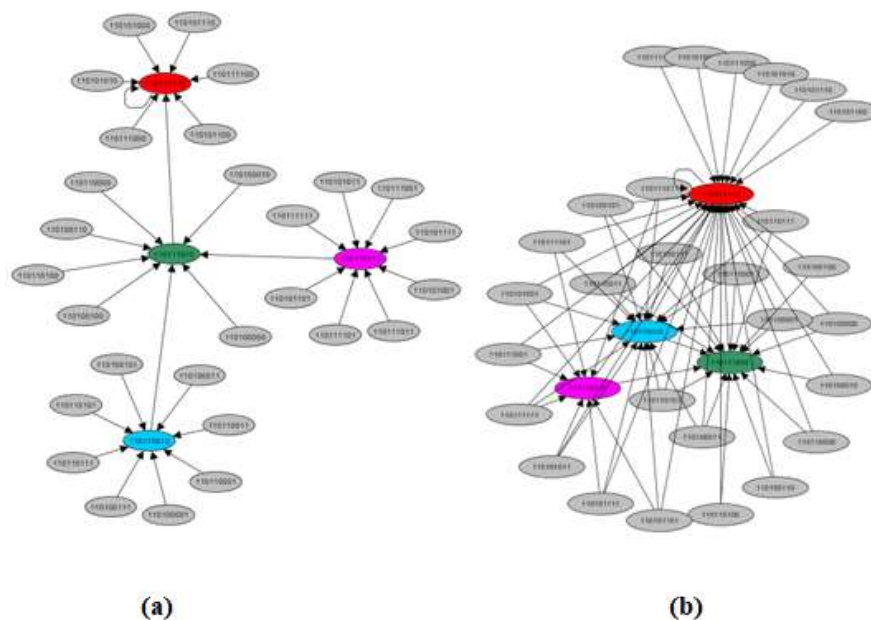


Figura 4: Paraqitja grafike e tranzicionit të gjendjeve drejt mbërritjes në pikën fikse. Grafi në të majtë (a) i takon përditësimit të nyjeve me metodën sinkrone dhe baseni i tërheqësave të tij përbëhet nga 32 gjendje dhe 32 lidhje midis tyre, ndërsa grafi në të djathtë (b) i takon metodës asinkrone, në të cilin baseni i tërheqësave përbëhet nga 32 gjendje dhe 72 lidhje midis tyre. Të dy grafit i takojnë evolimit të sistemit drejt të njëjtës pikë fikse, të shënuar me ngjyrë të kuqe. Nyjet e tjera të ngjyrosura tregojnë gjendje që tërheqin më shumë gjendje të tjera por që edhe vetë ato evoluojnë më pas drejt tërheqësit kryesor, pikës fikse (11011110).

Pikat fikse tregojnë gjendjet e qëndrueshme dhe të fundit në të cilat sistemi synon të konvergjojë dhe në momentin që hyn aty nuk mund të dalë më prej tyre. E thënë ndryshe, pasi sistemi mbërrin të futet në një nga gjendjet e tij të qëndrueshme, ai do të mbetet aty përgjithmonë dhe nuk do të ketë më asnjë mundësi që të dalë prej asaj gjendje. Për këtë arsye, për çdo gjendje stabil (pikë fikse) shikohet gjendja finale e çdo elementi biologjik, nëse ai është në gjendje aktive apo jo-aktive.

Fokusi kryesor është gjendja e mekanizmave (outputet) pasi nëpërmjet tyre sinjali i rregullimit do të transmetohet në pjesën tjetër të qelizave. Për një gjendje tumorale mekanizma të tillë si “Proliferation & Survival” (prolifimeri dhe faktorët e mbijetesës) dhe “Protein Synthesis” (sinteza e proteinave) janë procese që duhet të ndodhin, ndërsa “autophagi” (autofagia) është një proces që nuk duhet të ndodhë. Në këto kushte, nga të gjitha pikat fikse të gjetura veçohen vetëm ato që tregojnë një gjendje të fundit ku dy mekanizmat e parë të jenë ON (1) ndërsa mekanizmi i tretë të jetë OFF (0) dhe më tej shikohet

gjendja e elementëve të tjerë për të cilat arrihen këto vlera binare të këtyre mekanizmave.

Kështu, bazuar në rregullat Booleane për rrjetin e plotë (Figura 1.a), tre mekanizmat e lartpërmendura ndryshojnë në gjendje si më poshtë (Tabela 2).

Rezultatet	Mënyra rregullatore	Gjendja përfundimtare
Autophagy	autophagy* = NOT mTORC1	8 gjendje ON 8 gjendje OFF
Protein synthesis	protein synthesis* = mTORC1	8 gjendje ON 8 gjendje OFF
Proliferation & Survival	Proliferation & Survival* = Akt	4 gjendje ON 12 gjendje OFF

Table 2: Funkzionet Booleane të ndryshimit të gjendjeve të output-eve të rrjetit dhe gjendjet përfundimtare që ato arrijnë pasi sistemi arrin gjendjet e qëndrueshme.

Siç shikohet dhe nga tabela, një gjendje aktive e mTORC1 (1) do të plotësojë në të njëjtën kohë dy kushte: “autophagi” = 0 dhe “Protein Synthesis” = 1; ndërsa një gjendje aktive e proteinës Akt (1) do të plotësojë kushtin tjetër, ku “Proliferation & Survival” = 1. Kjo do të thotë, se nga të gjitha pikat fikse veçohen vetëm ato ku mTOR = 1 dhe Akt = 1. Nga ana tjetër, këto nuk janë kushtet e vetme që do të na duhet të marrim në konsideratë.

Një analizë e plotë e pikave fikse pa dyshim që do të kërkonte bashkëpunimin më të ngushtë me shkencën e bio-kimisë, për arsye se jo vetëm outputet, por edhe inputet (kushtet fillestare) në të cilat ndodh sistemi (Maheshwari *et al.* 2019; Maheshwari *et al.* 2020). I gjithë ky sistem, pikënisjen e ka nga gjendja e faktorëve hyrës siç janë “hypoxia”, “amino acids”, “low energy” dhe “growth factors”.

Gjendje të ndryshme të këtyre faktorëve, në kushte reale, do të ndikonte shumë në evoluimin e mëtejshëm të sistemit. Për pasojë, në varësi të gjendjes që ato kërkohen të jenë, bëhet një përzgjedhje tjetër e pikave fikse duke e reduktuar numrin e gjendjeve të qëndrueshme edhe më shumë. Si përfundim, mund të themi se përcaktimi i pikave fikse vetëm sa na informon për drejtimin që mund të marrë sistemi nisur nga kushtet fillestare të ndryshme. Vlerësimi i mëtejshëm i tyre, bëhet në bashkëpunim me specialitet të tjerë me qëllim përjashtimin e atyre gjendjeve jo të “shëndosha” për sistemin në fjalë dhe vlerësimin e gjendjeve të “shëndosha”.

Konkluzione

Shkrimi i funksioneve Booleane është një rrugë e thjeshtë për tu ndjekur, nëse ka informacion të mjaftueshëm nga të dhënat eksperimentale rreth mënyrës së bashkëveprimit midis elementëve të rrejtës. Në raste të tjera, kur këto të dhëna mungojnë, funksionet Booleane shkruhen sipas supozimeve logjike të zgjedhura për tu zbatuar. Studimi dhe analiza dinamike e sistemit biologjik të transmetimit të sinjalit të proteinës komplekse mTORC1 tregon se sistemi mund të arrijë matematikisht 16 gjendje të qëndrueshme. Këto gjendje të qëndrueshme përfaqësohen nga pikat fikse, të cilat duke qenë pika invariante në lidhje me kohën, nuk varen nga metoda e përfuturit të tyre. Theksi vihet në faktin se jo të gjitha gjendjet e qëndrueshme të përcaktuara, kanë kuptim biologjik.

Ky konkluzion arrihet në bazë të faktit se një sistem biologjik ka sjellje dhe nevoja specifike në varësi të kushteve në të cilat ndodhet. Në rastin e një gjendje tumorale mekanizma të ndryshëm, veprojnë në mënyra të ndryshme. Për këtë arsye, përzgjedhja e pikave fikse bëhet në varësi të funksionit të këtyre mekanizmave. Pavarësisht se modelimi mund të gjenerojë shumë pika fikse, përzgjedhja e disave dhe përjashtimi i të tjerave vetëm do të përmirësonte sistemin biologjik. Ne mendojmë se një përjasje e tillë teorike e një sistemi biologjik do të ndikonte edhe në zhvillimin e tyre të mëtejshëm eksperimental. Kështu, duke u njohur paraprakisht me gjendjet e mundshme të qëndrueshme, sistemi mund të nxitet eksperimentalisht me anë të mekanizmave të jashtëm që të ndjekë një rrjedhë të caktuar dhe jo një tjetër. Kjo do ndikonte në realizimin e një qëllimi të caktuar në varësi të kushteve dhe veçorive të sistemit.

Literatura

Cohen R., Havlin S. (2010): *Complex networks: structure, stability and function*, Cambridge University Press, ISBN-13: 978-0521841566, ISBN-10: 0521841569

Saadatpour A., Albert R. (2016): A comparative study of qualitative and quantitative dynamic models of biological regulatory networks. *EPJ Nonlinear Biomed Phys* 4,5

Kauffman S. (2004): A proposal for using the ensemble approach to understand genetic regulatory networks. *J. Theor. Biol.* 230: 581-590

Sengupta S., Peterson T. R., Sabatini D. M. (2010): Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Molecular cell*, 40(2), 310-322

Zoncu R., Efeyan A., Sabatini D. M. (2011): mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(1): 21-35

Efeyan A., Sabatini D. M. (2010): mTOR and cancer: many loops in one pathway. *Current opinion in cell biology*, 22(2), 169-176

Yip C. K., Murata K., Walz T., Sabatini D. M., Kang S. A. (2010): Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Molecular cell*, 38(5), 768-774

- Loewith R., Jacinto E., Wullschleger S., Lorberg A., Crespo J. L., Bonenfant D., Hall M. N. (2002): Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell*, 10(3), 457-468
- Saadatpour A., Albert R. (2013): Boolean modeling of biological regulatory networks: a methodology tutorial. *Methods*, 62(1), 3-12
- Helikar T., Kochi N., Konvalina J., A Rogers J. (2011): Boolean modeling of biochemical networks. *The Open Bioinformatics Journal*, 5(1)
- Abou-Jaoudé W., Traynard P., Monteiro P. T., Saez-Rodriguez J., Helikar T., Thieffry D., Chaouiya, C. (2016): Logical modeling and dynamical analysis of cellular networks. *Frontiers in genetics*, 7, 94
- Nikolajewa S., Friedel M., Wilhelm T. (2007): Boolean networks with biologically relevant rules show ordered behavior. *Biosystems*, 90(1), 40-47
- Chen K. C., Csikasz-Nagy A., Gyorffy B., Val J., Novak B., Tyson, J. J. (2000): Kinetic analysis of a molecular model of the budding yeast cell cycle. *Molecular biology of the cell*, 11(1), 369-391
- Radde N. (2012): Analyzing fixed points of intracellular regulation networks with interrelated feedback topology. *BMC systems biology*, 6(1), 1-16
- Taou N. S., Corne D. W., Lones, M. A. (2018): Investigating the use of Boolean networks for the control of gene regulatory networks. *Journal of computational science*, 26, 147-156
- Kociaj I. (2021): An Attractor Analysis of mTOR Signaling Pathway Synchronous Update of One Specific Initial State, *International Journal of Innovative Science and Research Technology* 6, nr. 1: 35-39
- Thomas R. (1973): Boolean formalization of genetic control circuit, *J. Theor. Biol.* 42: 563-585
- Albert R., Othmer H. G. (2003): The topology of the regulatory interactions predicts the expression pattern of the segment polarity genes in *Drosophila melanogaster*. *Journal of theoretical biology*, 223(1), 1-18
- Espinosa-Soto C., Padilla-Longoria P., Alvarez-Buylla E. R. (2004): A gene regulatory network model for cell-fate determination during *Arabidopsis thaliana* flower development that is robust and recovers experimental gene expression profiles. *The Plant Cell*, 16(11), 2923-2939
- Cha J., Lee I. (2020): Single-cell network biology for resolving cellular heterogeneity in human diseases. *Experimental & Molecular Medicine*, 1-11
- Albert I., Thakar J., Li S., Zhang R., Albert R. (2008): Boolean network simulations for life scientists. *Source code for biology and medicine*, 3(1), 1-8
- Maheshwari P., Du H., Sheen J., Assmann S. M., Albert R. (2019): Model-driven discovery of calcium-related protein-phosphatase inhibition in plant guard cell signaling. *PLoS computational biology*, 15(10), e1007429
- Maheshwari P., Assmann S. M., Albert R. (2020): A guard cell abscisic acid (ABA) network model that captures the stomatal resting state. *Frontiers in physiology*, 11, 927