

APLICACIONES REALES DE MODELOS BIOINSPIRADOS

Tema 5: Estudio de rutas señaladoras de proteínas.

David Orellana Martín
Mario de J. Pérez Jiménez

Grupo de investigación en Computación Natural
Dpto. Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial
Universidad de Sevilla

Máster Universitario en Lógica, Computación e Inteligencia Artificial

Curso 2023-2024



Objetivos

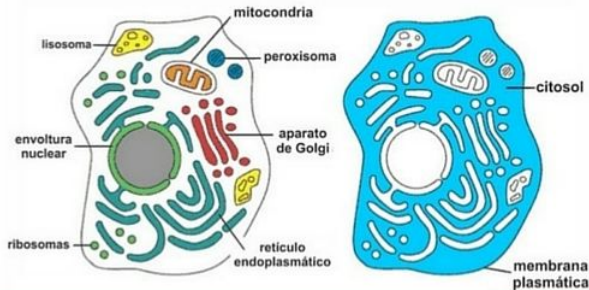
Señalización celular

Rutas señalizadoras de proteínas.

Aplicaciones de los **sistemas P multicompartimentales** a la modelización de **rutas señalizadoras de proteínas**.

- (a) Factor de crecimiento epidérmico: **EGF**.
- (b) Apoptosis mediatizada por la proteína **FAS**.
- (c) Comunicación inteligente de bacterias: **Quorum sensing**.

Citoplasma y citosol de una célula



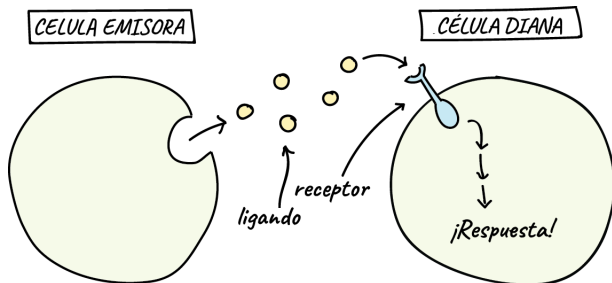
Citoplasma de una célula: “Interior” de una célula, a excepción del núcleo.

Citosol de una célula: Sustancia acuosa semifluida que forma parte del citoplasma (sin los orgánulos). Es el **medio** donde se desarrolla gran actividad celular.

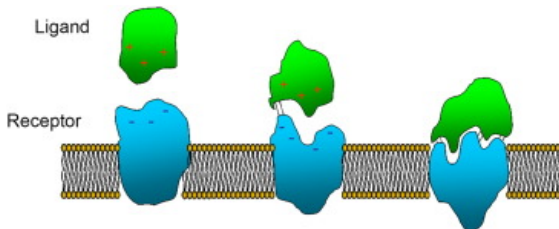
Señalización celular

Señalización celular: proceso biológico en el que intervienen, básicamente, dos células (**emisora** y **diana**):

- * Cada una produce una proteína (“complementarias”).
- * Célula **emisora**: **Ligando** o **señal** (enviada al exterior por la propia célula).
- * Célula **diana**: **Receptor** (situado sobre la membrana plasmática).



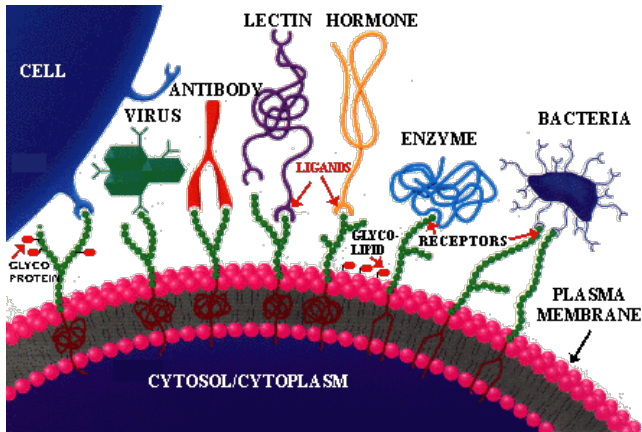
Los **receptores** son proteínas que constan de una parte extracelular (con una estructura 3D singular), una parte transmembrana y una parte intracelular.



Los **ligandos** son proteínas que tienen una estructura 3D “complementaria” a su receptor (con una forma molecular que permita el “acoplamiento”).

Reconocimiento de señales

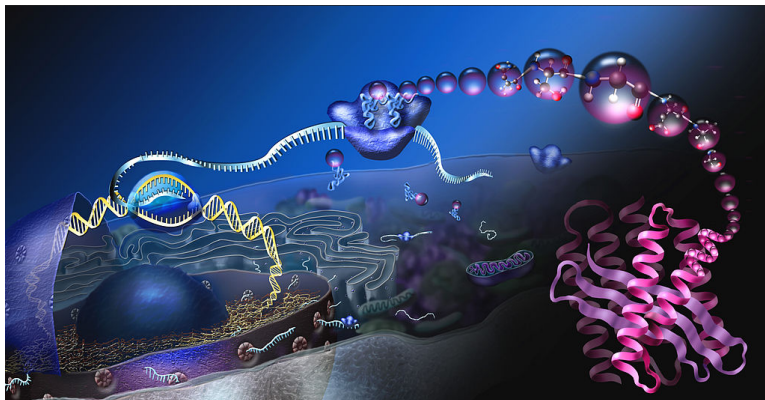
La membrana plasmática de una célula contiene un gran número de proteínas con la capacidad de reconocer señales químicas diversas.



Movimiento de las proteínas

La mayor parte de las proteínas se producen en el citosol.

Las proteínas necesitan **desplazarse** a distintos lugares de la célula (al exterior o al interior de la misma), a fin de realizar una determinada función.



Movimiento de las proteínas

Las células disponen de una especie de **servicio de transporte/mensajería** que permite enviar las proteínas a lugares específicos.

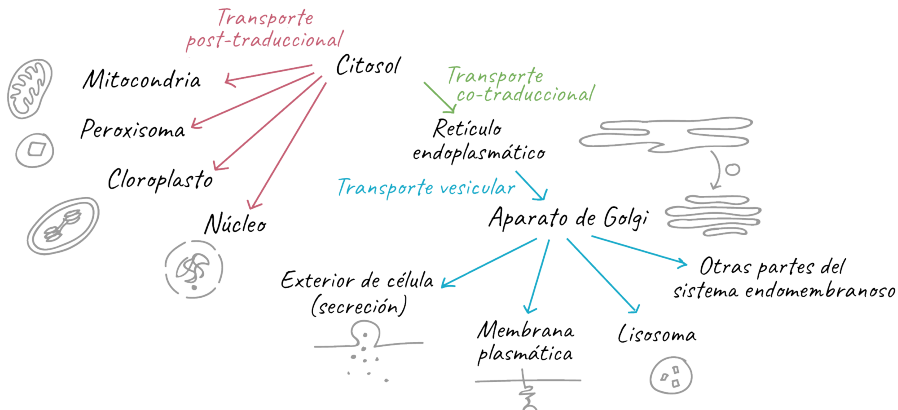
Ese “servicio” se materializa mediante una compleja **red de señales** que comunica las células con las proteínas.

Las proteínas se desplazan siguiendo una especie de *árbol de decisión*.

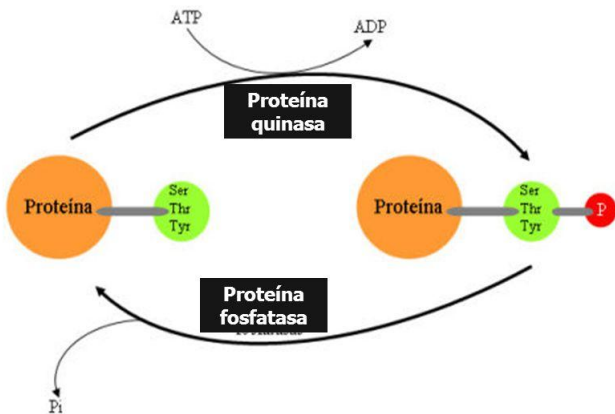
- * Las proteínas toman **decisiones** a través de unas **señales** (secuencias de aminoácidos).

De acuerdo con las **señales** que se “activen”, las proteínas se van desplazando de un lugar a otro, formándose auténticas **rutas** (algunas de gran complejidad).

Rutas señaladoras de proteínas

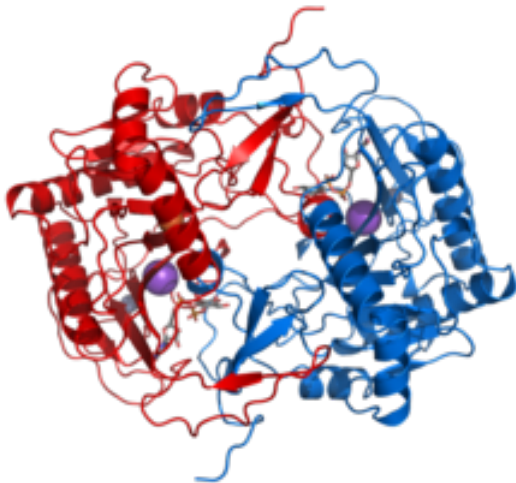


Fosforilación de una proteína: proceso químico mediante el cuál se le añade un grupo fosfato a la proteína

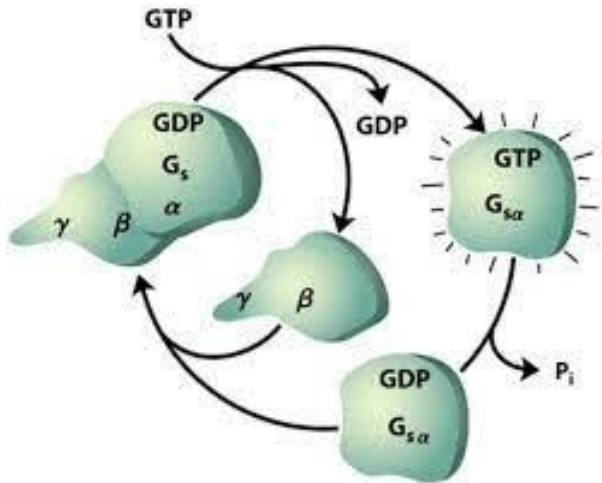


- * Propicia el transporte de energía y regula su actividad.

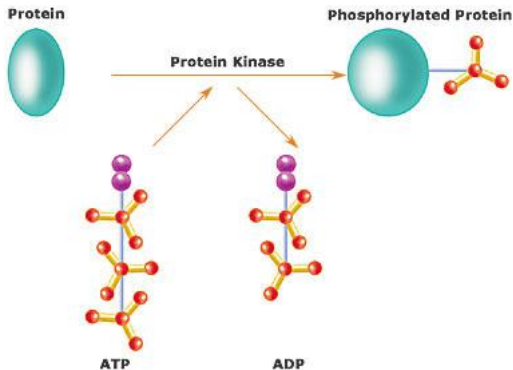
Dimerización: reacción química por la cuál dos moléculas idénticas forman una estructura única (**dímero**).



Proteína G: se activa al interactuar con **GTP** (“nucleótido” fosforilado) y se desactiva cuando interacciona con **GDP** (desfosforilación del **GTP**).

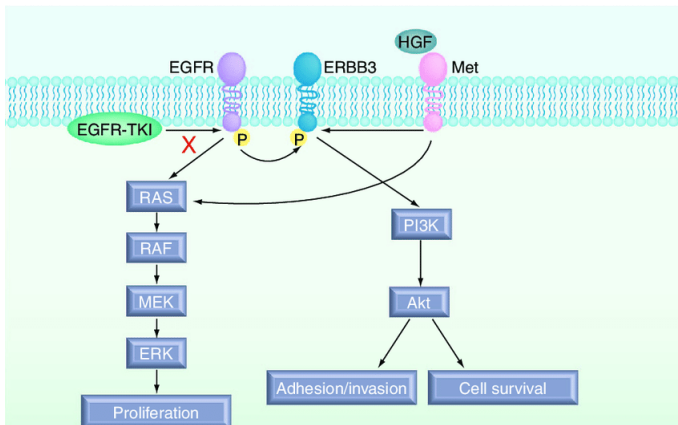


Proteína quinasa: modifica otras moléculas mediante un proceso de fosforilación (activándolas o desactivándolas).



* Ejemplos: **SOS**, **Ras**, **Raf**, **MEK**, **ERK**.

Proteína tirosina quinasa: Proteína quinasa que fosforila residuos de un aminoácido específico (la **tirosina**).

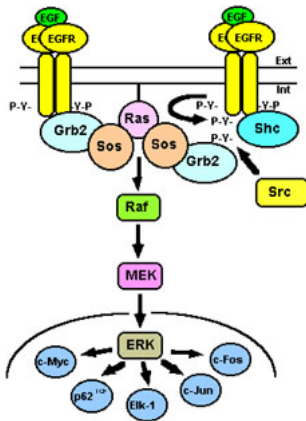


* Ejemplo: El receptor **EGFR** (Epidermal Growth Factor Receptor)

(a) Rutas del Factor de Crecimiento Epidérmico

Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor)

- * Sistema receptor más estudiado y mejor conocido (EGFR).



Los **modelos matemáticos**:

- ★ Han jugado un papel decisivo en ese conocimiento.
- ★ Han sido utilizados para analizar la dinámica del **EGFR** e interpretar las mutaciones del mismo.
- ★ Proporcionan hipótesis plausibles (**predicciones**) que pueden ser corroboradas experimentalmente.
- ★ Mejoran el conocimiento de funciones celulares complejas usando datos moleculares disponibles.

Las **rutas señalizadoras** de proteínas en las que intervienen el **EGFR** son especialmente interesantes para la investigación.

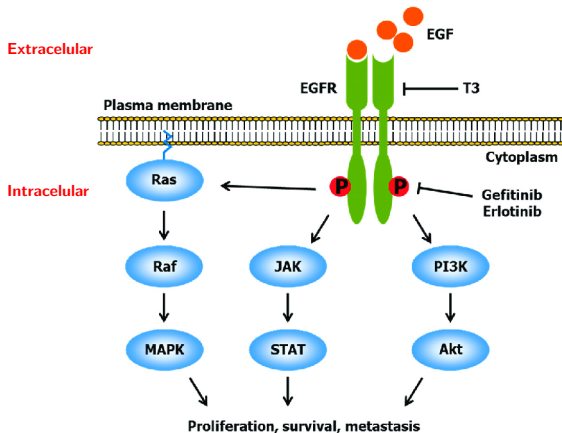
- * La activación del **EGFR** induce muchos procesos complejos.
- * El **EGFR** y otros miembros de su familia:
 - ★ Han sido dianas de terapias exitosas contra el cáncer
 - ★ Son cruciales para el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el **crecimiento celular**, en la **homeostasis tisular**, en diversas enfermedades, etc.
- ★ Se van a estudiar unas rutas señalizadoras del **EGFR**. Para ello:
 - * Se modelizará computacionalmente dichas rutas mediante un **modelo estocástico basado en sistemas P** (un sistema P multicompartimental).
 - ★ Se capturará la semántica del modelo utilizando el **algoritmo determinista de tiempo de espera** (se podría haber usado el **algoritmo multicompartimental de Gillespie**).

EGFR: primera proteína descubierta con actividad tirosina quinasa.

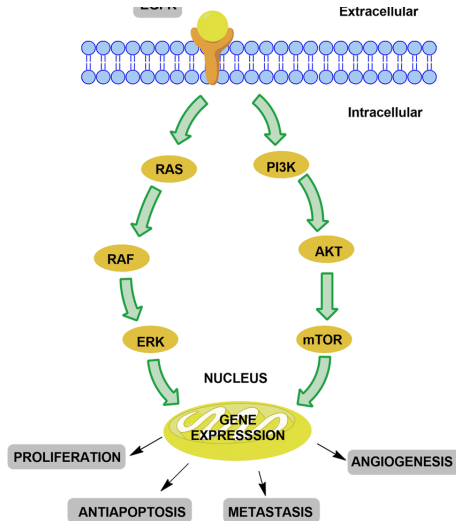
- * Ha sido usada en estudios pioneros de procesos biológicos relacionados con la oncogénesis (proceso mediante el cuál se produce un cáncer).

El receptor **EGFR** está colocado sobre la membrana plasmática.

- * Consta de dos subunidades idénticas: cada una con una parte extracelular, una parte transmembrana y una parte intracelular.



Rutas señaladoras que se estudian:



Comienzo de la ruta señalizadora del EGFR

Producción de ligandos **EGF** por parte de células inductoras/emisoras.

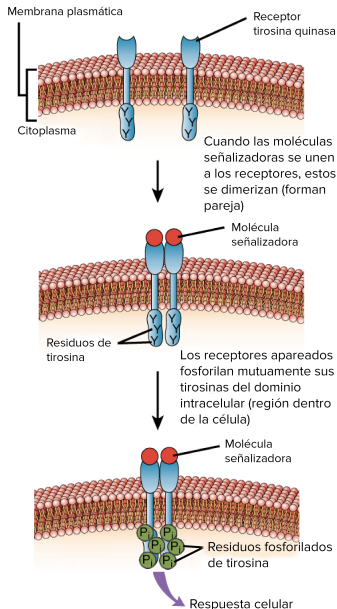
Los ligandos salen al exterior de la célula y van desplazándose por el medio.

Cuando el ligando **EGF** se une al dominio extracelular de su receptor (**EGFR**), propiciando:

- * La **dimerización** del mismo.
- * La **fosforilación** de su dominio intracelular.

Se forma el complejo **EGFR – EGF 2*** (es una **autofosforilación**).

- * Una gran cantidad de proteínas son reclutadas en el citosol iniciándose una compleja cascada de “señales”.



Respuesta celular

Y después ...

Ese dominio intracelular se **excita** y recluta una serie de proteínas que iniciarán una ruta señalizadora.

Frecuentemente, esa excitación provoca la unión de un **adaptador** (por ejemplo, la proteína **Grb2**) que provocará la activación de una serie de proteínas quinasas.

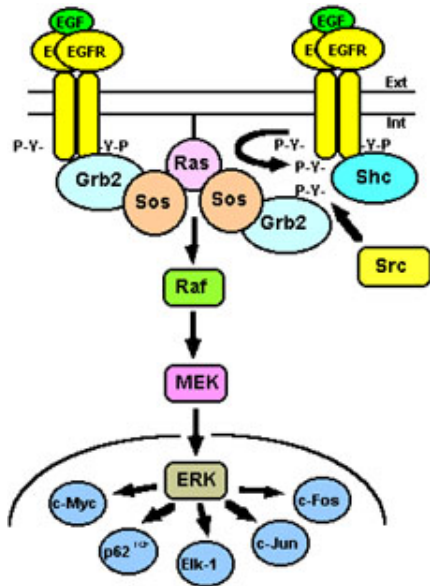
Grb2 atraerá y activará a **SOS**: una proteína **G** de tipo quinasa

SOS activará a la proteína **Ras** mediante fosforilación, la cuál activará, a su vez, a la proteína **Raf** por el mismo procedimiento.

Entonces, **Raf** provoca la fosforilación de la proteína **MEK**, activándola y propiciando la fosforilación de la proteína **ERK**.

Finalmente, la proteína **ERK** activada provocará, a su vez, la activación de una serie de proteínas efectoras.

Estas proteínas, o bien pueden tener una cierta función celular (crecimiento, apoptosis, supervivencia, etc.) o bien pueden contener factores de transcripción, con lo cual deberían trasladarse al núcleo para realizar su función.



En las rutas señalizadoras que estudiamos, se consideran dos **caminos marginales** y dos **principales**.

* **Primer camino marginal:**

- ★ La proteína *PLC* enlaza con *EGFR – EGF2** produciendo la fosforilación *PLC**: ésta pasa al citoplasma, en donde puede ser desfosforilada o reconducida a la membrana celular.

* **Segundo camino marginal:**

- ★ La proteína *PI3K* enlaza con *EGFR – EGF2** produciendo la fosforilación *PI3K**: ésta pasa al citoplasma, en donde regula unas proteínas (AKT, mTOR) que intervienen en la división celular y no se incluyen en el modelo.

Camino principales:

* Primer camino principal:

- ★ No depende de la concentración de la proteína **Shc**.
- ★ Es un ciclo en donde las proteínas **Grb2** y **SOS** enlazan con $EGFR - EGF2^*$, tras lo cual el complejo $Grb2 - SOS$ pasa al citoplasma. En ese proceso, **SOS** activará a la proteína **Ras** (pasando de **Ras-GDP** a **Ras-GTP**).

* Segundo camino principal:

- ★ La proteína **Shc** enlaza con $EGFR - EGF2^*$ y es fosforilada (**Shc^{*}**).
- ★ Entonces, o bien **Shc^{*}** pasa al citoplasma o bien **Grb2** y **SOS** enlaza con $EGFR - EGF2^* - Shc^*$ formando el complejo $EGFR - EGF2^* - Shc^* - Grb2 - SOS$ que producirá la activación de la proteína **Ras** (pasando de **Ras-GDP** a **Ras-GTP**).

- ★ A partir de estos caminos, la proteína **Ras-GTP** provocará la fosforilación de las proteínas **Raf**, **MEK** y **ERK**.
- ★ Finalmente, la proteína **ERK** fosforilada regulará varias proteínas celulares y algunos factores de transcripción.
- ★ Existen unos **camino cruzados**: Robustez del sistema.

Un modelo basado en sistemas P multicompartimentales¹

Nuestro modelo sera un sistema P multicompartimental que consta de un único entorno que contiene un único sistema P, que notaremos Π_{EGF} .

En el modelo se van a representar:

- ★ 60 proteínas y complejos proteínicos.
- ★ 160 reacciones químicas.

Específicamente, $\Pi_{\text{EGF}} = (O, \{e, s, c\}, \mu, (\mathcal{M}_1, e), (\mathcal{M}_2, s), (\mathcal{M}_3, c), \mathcal{R}_e, \mathcal{R}_s, \mathcal{R}_c)$, donde:

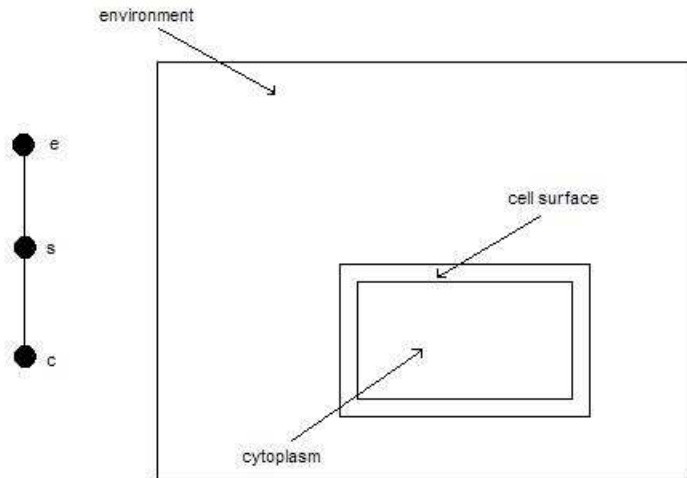
Alfabeto de trabajo O : Representamos las proteínas y complejos *relevantes*.

Object	Protein or Complex
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFR-EGF2	Dimerised Receptor
EGFR-EGF2*-Shc	EGFR-EGF2* and Shc complex
⋮	⋮
MEK	Mitogenic External Regulated Kinase
ERK	External Regulated Kinase

¹ **M.J. Pérez-Jiménez, F.J. Romero.** A study of the robustness of the EGFR signalling cascade using

Estructura de membranas μ : Se consideran tres membranas, etiquetadas por

- ★ **e**: representará el *entorno* (raíz del árbol).
- ★ **s**: representará la *superficie celular* (hija de **e**).
- ★ **c**: representará el *citoplasma* (hija de **s**).



Multiconjuntos iniciales: Serán considerados en función del escenario que nos interese analizar.

Algunos datos podrían ser (Moehren et al., 2002²)

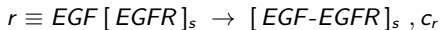
$$\begin{aligned}\mathcal{M}_1 &= \{EGF^{20000}\} \\ \mathcal{M}_2 &= \{EGFR^{25000}, Ras-GDP^{20000}\} \\ \mathcal{M}_3 &= \{Shc^{25000}, PLC_\gamma^{15000}, PI3K^{5000}, SOS^{4000}, Grb2^{8000}, TP_1^{10000}, TP_2^{45000}, \\ &\quad TP_3^{45000}, TP_4^{12500}, Raf^{8000}, MEK^{40000}, ERK^{40000}, P_1^{8000}, P_2^{8000}, P_3^{30000}\}\end{aligned}$$

² G. Moehren, N.I. Markevich, O. Demin, A. Klyatkin, I. Goryanin, J.B. Hoek, B.N. Kholodenko.

Temperature dependence of the Epidermal Growth Factor Receptor signaling network can be accounted for by a kinetic model. **Biochemistry**, **41** (2002), 306-320.

Reglas: Se representan las **160 reacciones químicas** que intervienen en la ruta objeto de estudio.

- * Ilustración de una regla de $\mathcal{R}_e$ asociada a la membrana raíz **e**:



Esta regla representa el enlace de un ligando **EGF** con su receptor **EGFR**.

- ★ El ligando **EGF** situado en la membrana **e** y el receptor **EGFR**, situado en la membrana **s**, producen el complejo $EGFR - EGF$ en la membrana **s**.
- ★ La regla tiene asociada una constante cinética que permite calcular la **constante estocástica** c_r (afinidad “ligando-receptor”).
- ★ El **tiempo de espera** asociado a dicha regla se calcula como sigue:

$$\tau_r = \frac{1}{c_r \cdot |EGF| \cdot |EGFR|}$$

- * Ilustración de una regla de $\mathcal{R}_s$ asociada a la membrana **s**:

$$r' \equiv [EGFR - EGF, EGFR - EGF]_s \rightarrow [EGFR - EGF2]_s, c_{r'}$$

- ★ Esta regla representa la dimerización del complejo $EGFR - EGF$.
- ★ Dicha regla tendrá asociada una constante cinética que permite calcular la **constante estocástica** $c_{r'}$.
- ★ El **tiempo de espera** asociado a dicha regla se calcula como sigue:

$$\tau_{r'} = \frac{1}{c_{r'} \cdot |EGFR - EGF|^2}$$

Tabla 1 (I)

Symbol	Protein
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFR-EGF	EGFR and EGF complex
EGFR-EGF2	Dimerised Receptor
EGFR-EGF2*	Phosphorylated Receptor
TP1, TP2, TP3, TP4	Tyrosine Phosphatase 1,2,3,4
EGFR-EGF2*-TP1	Phosphorylated Receptor, TP 1 complex
EGFR-EGF2-TP1	Receptor, TP1 complex
PLC	Phospholipase C- γ
PLC*	Phosphorylated PLC
EGFR-EGF2*-PLC	Phosphorylated Receptor and PLC complex
EGFR-EGF2*-PLC*	Phosphorylated Receptor and PLC* complex
PLC*.TP2	PLC* and TP2 complex
PLC-TP2	PLC and TP2 complex

Tabla 1 (II)

PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI3K*	Phosphorylated PI3K
EGFR-EGF2*-PI3K	Phosphorylated receptor and PI3K complex
EGFR-EGF2*-PI3K*	Phosphorylated receptor and PI3K* complex
PI3K*-TP4	PI3K* and TP4 complex
PI3K-TP4	PI3K and TP4 complex
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
EGFR-EGF2*-Grb2	Phosphorylated receptor and Grb2 complex
SOS	Son of sevenless homologue protein
EGFR-EGF2*-Grb2-SOS	Phosphorylated receptor, Grb2, SOS complex
Grb2-SOS	Grb2 and SOS complex
Shc	src homology 2 domain
Shc*	Phosphorylated Shc
EGFR-EGF2*-Shc	Phosphorylated receptor and Shc complex
EGFR-EGF2*-Shc*	Phosphorylated receptor and Shc* complex
Shc*-TP3	Shc* and TP3 complex

Tabla 1 (III)

Shc-TP3	Shc and TP3 complex
EGFR-EGF2*-Shc*-Grb2	Phosphorylated receptor, Shc* and Grb2 complex
EGFR-EGF2*-Shc*-Grb2-SOS	Phosphorylated receptor, Shc*, Grb2 and SOS complex
Shc*-Grb2-SOS	Shc*, Grb2 and SOS complex
Shc*-Grb2-SOS	Shc* and Grb2complex
Ras-GDP	Ras protein
Ras-GTP	Hydrolised Ras protein
Ras-GTP*	Phosphorylated Ras-GTP*
Raf	Raf protein
Raf*	Phosphorylated Raf
Ras-GTP-Raf	Ras-GTP and Raf complex
MEK	Mitogen-activated Protein Kinase
MEK-P	Phosphorylated MEK
ERK	External Regulated Kinase
ERK-P	Phosphorylated ERK

Tabla 1 (IV)

ERK-PP	Doubled Phosphorylated ERK
Raf*-MEK	Raf* and MEK complex
Raf*-MEK-P	Raf* and MEK-P complex
MEK-PP-ERK	MEK-PP and ERK complex
MEK-PP-ERK-P	MEK-PP and ERK-P complex
P2, P3	Phosphatases 2,3
MEK-P-P2	MEK-P and P2 complex
MEK-PP-P2	MEK-PP and P2 complex
ERK-P-P3	ERK-P and P3 complex
ERK-PP-P3	ERK-PP and P3 complex

Tabla 2 (I)

Protein	Concentration (nM)	Reference
EGFR	100	Moehren et al 2002
Shc	250	Moehren et al 2002
PLC γ	150	Moehren et al 2002
PI3K	50	Moehren et al 2002
SOS	40	Moehren et al 2002
Grb2	80	Moehren et al 2002
TP ₁	100	Moehren et al 2002
TP ₂	450	Moehren et al 2002
TP ₃	250	Moehren et al 2002
TP ₄	125	Moehren et al 2002
Ras-GDP	200	Schoeberl et al 2002
Raf	80	Schoeberl et al 2002

Tabla 2 (II)

MEK	400	Schoeberl et al 2002
ERK	400	Schoeberl et al 2002
CCP	160	Schoeberl et al 2002
Phosp ₁	80	Schoeberl et al 2002
Phosp ₂	80	Schoeberl et al 2002
Phosp ₃	300	Starbuck et at 1992

Tabla 3: EGF Binding and Receptor Phosphorylation

Reaction	Rule	Kinetic Constant	Reference
1	$\text{EGF } [\text{EGFR}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF}]_s$	3×10^{-3}	Moehren et al 2002
2	$[\text{EGFR-EGF}]_s \rightarrow \text{EGF } [\text{EGFR}]_s$	6×10^{-2}	Moehren et al 2002
3	$[\text{EGFR-EGF EGFR-EGF}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}]_s$	1.1×10^{-2}	Moehren et al 2002
4	$[\text{EGFR-EGF2}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF EGFR-EGF}]_s$	0.814	Moehren et al 2002
5	$[\text{EGFR-EGF2}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*]_s$	2.71	Moehren et al 2002
6	$[\text{EGFR-EGF2}^*]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}]_s$	0.0271	Moehren et al 2002
7	$\text{EGFR-EGF2}^* [\text{TP}_1]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* \text{-TP}_1[]_c$	0.03	Moehren et al 2002
8	$\text{EGFR-EGF2}^* \text{-TP}_1[]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* [\text{TP}_1]_c$	5.91	Moehren et al 2002
9	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-TP}_1]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2-TP}_1]_s$	7.44	Moehren et al 2002
10	$\text{EGFR-EGF2-TP}_1[]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2 } [\text{TP}_1]_c$	5.1×10^{-3}	Moehren et al 2002
11	$\text{EGFR-EGF2 } [\text{TP}_1]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2-TP}_1[]_c$	2×10^{-4}	Moehren et al 2002

Tabla 4: Receptor Internalization and Degradation

Reaction	Rule	Kinetic Constant	Reference
12	$\text{EGFR []}_c \rightarrow [\text{EGFR}]_c$	5×10^{-5}	Starbuck et al 1992
13	$[\text{EGFR}]_c \rightarrow \text{EGFR []}_c$	5×10^{-3}	Starbuck et al 1992
14	$\text{EGFR-EGF2}^*[\]_c \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*]_c$	5×10^{-5}	Starbuck et al 1992
15	$[\text{EGFR}]_c \rightarrow [\]_c$	6.64×10^{-4}	Starbuck et al 1992
16	$[\text{EGFR-EGF2}^*]_c \rightarrow [\]_c$	6.64×10^{-4}	Starbuck et al 1992
17	$[\text{EGF}]_c \rightarrow [\]_c$	1.67×10^{-4}	Starbuck et al 1992
18	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2 CPP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-CPP}]_s$	1.73×10^{-7}	Starbuck et al 1992
19	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-CPP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2 CPP}]_s$	1.66×10^{-3}	Starbuck et al 1992
20	$\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-CPP []}_c \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2 CPP}]_c$	0.003	Wiley 1988
21	$[\text{CPP}]_c \rightarrow \text{CPP []}_c$	10^{-5}	Starbuck et al 1992

Tabla 5: PLC γ cycle

Reaction	Rule	Kinetic Constant	Reference
22	$\text{EGFR-EGF2}^* [\text{PLC}\gamma]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* \text{-PLC}\gamma [\]_c$	0.1	Moehren et al 2002
23	$\text{EGFR-EGF2}^* \text{-PLC}\gamma [\]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* [\text{PLC}\gamma]_c$	1	Moehren et al 2002
24	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-PLC}\gamma]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-PLC}\gamma^*]_s$	10	Moehren et al 2002
25	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-PLC}\gamma^*]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-PLC}\gamma]_s$	0.1	Moehren et al 2002
26	$\text{EGFR-EGF2}^* \text{-PLC}\gamma^* [\]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* [\text{PLC}\gamma^*]_c$	1.5×10^{-4}	Moehren et al 2002
27	$\text{EGFR-EGF2}^* [\text{PLC}\gamma^*]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* \text{-PLC}\gamma^* [\]_c$	7.5×10^{-8}	Moehren et al 2002
28	$\text{PLC}\gamma^* [\]_s \rightarrow [\text{PLC}\gamma^*]_s$	1	Kholodenko et al 1999
29	$[\text{PLC}\gamma^*]_s \rightarrow \text{PLC}\gamma^* [\]_s$	0.03	Kholodenko et al 1999
30	$[\text{PLC}\gamma^* \text{TP}_2]_c \rightarrow [\text{PLC}\gamma^* \text{-TP}_2]_c$	1.5×10^{-4}	Moehren et al 2002
31	$[\text{PLC}\gamma^* \text{-TP}_2]_c \rightarrow [\text{PLC}\gamma^* \text{TP}_2]_c$	1.5×10^{-3}	Moehren et al 2002
32	$[\text{PLC}\gamma^* \text{-TP}_2]_c \rightarrow [\text{PLC}\gamma \text{-TP}_2]_c$	0.1	Moehren et al 2002
33	$[\text{PLC}\gamma \text{-TP}_2]_c \rightarrow [\text{PLC}\gamma \text{TP}_2]_c$	1×10^{-5}	Moehren et al 2002
34	$[\text{PLC}\gamma \text{TP}_2]_c \rightarrow [\text{PLC}\gamma \text{-TP}_2]_c$	1.8×10^{-7}	Moehren et al 2002

Tabla 6: Grb2 cycle

Reaction	Rule	Kinetic Constant	Reference
35	$\text{EGFR-EGF2}^* [\text{Grb2}]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2 []}_c$	1.5×10^{-3}	Moehren et al 2002
36	$\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2 []}_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* [\text{Grb2}]_c$	0.2	Moehren et al 2002
37	$\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2 [SOS]}_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS []}_c$	0.01	Moehren et al 2002
38	$\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS []}_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2 [SOS]}_c$	0.06	Moehren et al 2002
39	$\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS []}_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* [\text{Grb2-SOS}]_c$	2.8×10^{-3}	Moehren et al 2002
40	$\text{EGFR-EGF2}^* [\text{Grb2-SOS}]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS []}_c$	5.3×10^{-5}	Moehren et al 2002
41	$[\text{Grb2-SOS}]_c \rightarrow [\text{Grb2 SOS}]_c$	1×10^{-4}	Moehren et al 2002
42	$[\text{Grb2 SOS}]_c \rightarrow [\text{Grb2-SOS}]_c$	6.7×10^{-6}	Moehren et al 2002

Tabla 7: Shc cycle (I)

Reaction	Rule	Kinetic Constant	Reference
43	$\text{EGFR-EGF2}^* [\text{Shc}]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc} []_c$	0.1	Moehren et al 2002
44	$\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc} []_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* [\text{Shc}]_c$	1	Moehren et al 2002
45	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^*]_s$	20	Moehren et al 2002
46	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^*]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}]_s$	0.2	Moehren et al 2002
47	$\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* []_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* [\text{Shc}^*]_c$	5×10^{-4}	Moehren et al 2002
48	$\text{EGFR-EGF2}^* [\text{Shc}^*]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* []_c$	3.56×10^{-7}	Moehren et al 2002
49	$[\text{Shc}^* \text{ TP}_3]_c \rightarrow [\text{Shc}^* \text{-TP}_3]_c$	5×10^{-3}	Moehren et al 2002
50	$[\text{Shc}^* \text{-TP}_3]_c \rightarrow [\text{Shc}^* \text{ TP}_3]_c$	9.5×10^{-2}	Moehren et al 2002
51	$[\text{Shc}^* \text{-TP}_3]_c \rightarrow [\text{Shc} \text{-TP}_3]_c$	0.15	Moehren et al 2002
52	$[\text{Shc} \text{-TP}_3]_c \rightarrow [\text{Shc} \text{ TP}_3]_c$	2×10^{-4}	Moehren et al 2002
53	$[\text{Shc} \text{ TP}_3]_c \rightarrow [\text{Shc} \text{-TP}_3]_c$	4×10^{-6}	Moehren et al 2002
54	$\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* [\text{Grb2}]_c \rightarrow \text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2} []_c$	1.5×10^{-3}	Moehren et al 2002
55	$\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2} []_c \rightarrow \text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* [\text{Grb2}]_c$	4.95×10^{-2}	Moehren et al 2002

Tabla 7: Shc cycle (II)

56	$\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2[]}_c \rightarrow \text{EGFR2}^* [\text{Shc}^* \text{-Grb2}]_c$	6.5×10^{-4}	Moehren et al 2002
57	$\text{EGFR2}^* [\text{Shc}^* \text{-Grb2}]_c \rightarrow \text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2[]}_c$	1.4×10^{-6}	Moehren et al 2002
58	$[\text{Shc}^* \text{-Grb2}]_c \rightarrow [\text{Shc}^* \text{ Grb2}]_c$	1×10^{-3}	Moehren et al 2002
59	$[\text{Shc}^* \text{ Grb2}]_c \rightarrow [\text{Shc}^* \text{-Grb2}]_c$	1×10^{-5}	Moehren et al 2002
60	$\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2[SOS]}_c \rightarrow \text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS[]}_c$	0.015	Moehren et al 2002
61	$\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS[]}_c \rightarrow \text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2[SOS]}_c$	0.03	Moehren et al 2002
62	$\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS[]}_c \rightarrow \text{EGFR2}^* [\text{Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c$	1.1×10^{-3}	Moehren et al 2002
63	$\text{EGFR2}^* [\text{Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c \rightarrow \text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS[]}_c$	2.37×10^{-6}	Moehren et al 2002
64	$[\text{Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c \rightarrow [\text{Shc}^* \text{-Grb2 SOS}]_c$	0.06	Moehren et al 2002
65	$[\text{Shc}^* \text{-Grb2 SOS}]_c \rightarrow [\text{Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c$	0.03	Moehren et al 2002
66	$[\text{Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c \rightarrow [\text{Shc}^* \text{ Grb2-SOS}]_c$	0.035	Moehren et al 2002
67	$[\text{Shc}^* \text{ Grb2-SOS}]_c \rightarrow [\text{Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c$	2.5×10^{-3}	Moehren et al 2002
68	$\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* [\text{Grb2-SOS}]_c \rightarrow \text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS []}_c$	0.5	Moehren et al 2002
69	$\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS []}_c \rightarrow \text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* [\text{Grb2-SOS}]_c$	0.1	Moehren et al 2002

Tabla 8: Internalized Receptor Activity (I)

Reaction	Rules	Kinetic Constant	Reference
70	$[EGF\ EGFR]_c \rightarrow [EGFR-EGF]_c$	3×10^{-3}	Moehren et al 2002
71	$[EGFR\ EGF]_c \rightarrow [EGF\ EGFR]_c$	0.06	Moehren et al 2002
72	$[EGFR-EGF\ EGFR-EGF]_c \rightarrow [EGFR-EGF2]_c$	1.1×10^{-2}	Moehren et al 2002
73	$[EGFR-EGF2]_c \rightarrow [EGFR-EGF\ EGFR-EGF]_c$	0.814	Moehren et al 2002
74	$[EGFR-EGF2]_c \rightarrow [EGFR-EGF2^*]_c$	2.71	Moehren et al 2002
75	$[EGFR-EGF2^*]_c \rightarrow [EGFR-EGF2]_c$	0.0271	Moehren et al 2002
76	$[EGFR-EGF2^*\ TP_1]_c \rightarrow [EGFR-EGF2^*-TP_1]_c$	0.03	Moehren et al 2002
77	$[EGFR-EGF2^*-TP_1]_c \rightarrow [EGFR-EGF2^*\ TP_1]_c$	5.91	Moehren et al 2002
78	$[EGFR-EGF2^*-TP_1]_c \rightarrow [EGFR-EGF2-TP_1]_c$	7.44	Moehren et al 2002
79	$[EGFR-EGF2-TP_1]_c \rightarrow [EGFR-EGF2\ TP_1]_c$	5.1×10^{-3}	Moehren et al 2002
80	$[EGFR-EGF2\ TP_1]_c \rightarrow [EGFR-EGF2-TP_1]_c$	2×10^{-4}	Moehren et al 2002
81	$[EGFR-EGF2^*\ Grb2]_c \rightarrow [EGFR-EGF2^*-Grb2]_c$	1.5×10^{-3}	Moehren et al 2002
82	$[EGFR-EGF2^*-Grb2]_c \rightarrow [EGFR-EGF2^*\ Grb2]_c$	0.2	Moehren et al 2002
83	$[EGFR-EGF2^*-Grb2\ SOS]_c \rightarrow [EGFR-EGF2^*-Grb2-SOS]_c$	0.01	Moehren et al 2002

Tabla 8: Internalized Receptor Activity (II)

84	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS}]_c \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2 SOS}]_c$	0.06	Moehren et al 2002
85	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS}]_c \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{ Grb2-SOS}]_c$	2.8×10^{-3}	Moehren et al 2002
86	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{ Grb2-SOS}]_c \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS}]_c$	5.3×10^{-5}	Moehren et al 2002
87	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{ Shc}]_c \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Shc}]_c$	0.1	Moehren et al 2002
88	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Shc}]_c \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{ Shc}]_c$	1	Moehren et al 2002
89	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Shc}]_c \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Shc}^*]_c$	20	Moehren et al 2002
90	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Shc}^*]_c \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Shc}]_c$	0.2	Moehren et al 2002
91	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Shc}^*]_c \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{ Shc}^*]_c$	5×10^{-4}	Moehren et al 2002
92	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{ Shc}^*]_c \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Shc}^*]_c$	3.56×10^{-7}	Moehren et al 2002
93	$[\text{EGFR2}^*-\text{Shc}^* \text{ Grb2}]_c \rightarrow [\text{EGFR2}^*-\text{Shc}^*-\text{Grb2}]_c$	1.5×10^{-3}	Moehren et al 2002
94	$[\text{EGFR2}^*-\text{Shc}^*-\text{Grb2}]_c \rightarrow [\text{EGFR2}^*-\text{Shc}^* \text{ Grb2}]_c$	4.95×10^{-2}	Moehren et al 2002
95	$[\text{EGFR2}^*-\text{Shc}^*-\text{Grb2}]_c \rightarrow [\text{EGFR2}^* \text{ Shc}^*-\text{Grb2}]_c$	6.5×10^{-4}	Moehren et al 2002
96	$[\text{EGFR2}^* \text{ Shc}^*-\text{Grb2}]_c \rightarrow [\text{EGFR2}^*-\text{Shc}^*-\text{Grb2}]_c$	1.4×10^{-6}	Moehren et al 2002
97	$[\text{EGFR2}^*-\text{Shc}^*-\text{Grb2 SOS}]_c \rightarrow [\text{EGFR2}^*-\text{Shc}^*-\text{Grb2-SOS}]_c$	0.015	Moehren et al 2002

Tabla 8: Internalized Receptor Activity (III)

98	$[\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c \rightarrow [\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2 SOS}]_c$	0.03	Moehren et al 2002
99	$[\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c \rightarrow [\text{EGFR2}^* \text{ Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c$	1.1×10^{-3}	Moehren et al 2002
100	$[\text{EGFR2}^* \text{ Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c \rightarrow [\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c$	2.37×10^{-6}	Moehren et al 2002
101	$[\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{ Grb2-SOS}]_c \rightarrow [\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c$	0.5	Moehren et al 2002
102	$[\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS}]_c \rightarrow [\text{EGFR2}^* \text{-Shc}^* \text{ Grb2-SOS}]_c$	0.1	Moehren et al 2002

Tabla 9: PI3K branch

Reaction	Rules	Kinetic Constant	Reference
103	$\text{EGFR-EGF2}^* [\text{PI3K}]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* \text{-PI3K} []_c$	0.1	Moehren et al 2002
104	$\text{EGFR-EGF2}^* \text{-PI3K} []_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* [\text{PI3K}]_c$	2	Moehren et al 2002
105	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-PI3K}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-PI3K}^*]_s$	9.85	Moehren et al 2002
106	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-PI3K}^*]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-PI3K}]_s$	0.985	Moehren et al 2002
107	$\text{EGFR-EGF2}^* \text{-PI3K}^* []_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* [\text{PI3K}^*]_c$	0.047	Moehren et al 2002
108	$\text{EGFR-EGF2}^* [\text{PI3K}^*]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^* \text{-PI3K}^* []_c$	4.82×10^{-5}	Moehren et al 2002
109	$[\text{PI3K}^* \text{-TP}_4]_c \rightarrow [\text{PI3K}^* \text{-TP}_4]_c$	7×10^{-4}	Moehren et al 2002
110	$[\text{PI3K}^* \text{-TP}_4]_c \rightarrow [\text{PI3K}^* \text{-TP}_4]_c$	7×10^{-3}	Moehren et al 2002
111	$[\text{PI3K}^* \text{-TP}_4]_c \rightarrow [\text{PI3K} \text{-TP}_4]_c$	0.03	Moehren et al 2002
112	$[\text{PI3K} \text{-TP}_4]_c \rightarrow [\text{PI3K} \text{-TP}_4]_c$	8×10^{-5}	Moehren et al 2002
113	$[\text{PI3K} \text{-TP}_4]_c \rightarrow [\text{PI3K} \text{-TP}_4]_c$	6.7×10^{-6}	Moehren et al 2002

Tabla 10: Ras and Raf activation (I)

Reaction	Rules	Kinetic Constant	Reference
114	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS Ras-GDP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s$	0.015	Schoeberl et al 2002
115	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS Ras-GDP}]_s$	1.3	Schoeberl et al 2002
116	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS Ras-GTP}]_s$	0.5	Sermon et al 1998
117	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS Ras-GTP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s$	1×10^{-4}	Sermon et al 1998
118	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS Ras-GTP}^*]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s$	2.1×10^{-3}	Schoeberl et al 2002
119	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS Ras-GTP}^*]_s$	0.4	Schoeberl et al 2002
120	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS Ras-GDP}]_s$	0.023	Schoeberl et al 2002
121	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS Ras-GDP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s$	2.2×10^{-4}	Schoeberl et al 2002
122	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Shc}^*-\text{Grb2-SOS Ras-GDP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Shc}^*-\text{Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s$	0.015	Schoeberl et al 2002
123	$[\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Shc}^*-\text{Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Shc}^*-\text{Grb2-SOS Ras-GDP}]_s$	1.3	Schoeberl et al 2002

Tabla 10: Ras and Raf activation (II)

Reaction	Rules	Kinetic Constant	Reference
124	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s$	0.5	Sermon et al 1998
125	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s$	1×10^{-4}	Sermon et al 1998
126	$[\text{Ras-GTP-Raf}]_s \rightarrow [\text{Ras-GTP-Raf}]_s$	0.001	Sydor et al 1998
127	$[\text{Ras-GTP-Raf}]_s \rightarrow [\text{Ras-GTP-Raf}]_s$	0.0053	Sydor et al 1998
128	$[\text{Ras-GTP-Raf}]_s \rightarrow [\text{Ras-GTP}^* \text{-Raf}^*]_s$	1	Sydor et al 1998
129	$[\text{Ras-GTP}^* \text{-Raf}^*]_s \rightarrow [\text{Ras-GTP-Raf}]_s$	7×10^{-4}	Sydor et al 1998
130	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GTP}^*]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s$	7.9×10^{-3}	Schoeberl et al 2002
131	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GTP}^*]_s$	0.3	Schoeberl et al 2002
132	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s$	0.023	Schoeberl et al 2002
133	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Shc}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s$	2.2×10^{-4}	Schoeberl et al 2002

Tabla 11: MEK and ERK activation (I)

Reaction	Rules	Kinetic Constant	Reference
134	$\text{Raf}^* [\text{Phosp}_1]_c \rightarrow \text{Raf}^* \text{-Phosp}_1 []_c$	0.0717	Huang et al 1996
135	$\text{Raf}^* \text{-Phosp}_1 []_c \rightarrow \text{Raf}^* [\text{Phosp}_1]_c$	0.2	Huang et al 1996
136	$\text{Raf}^* \text{-Phosp}_1 []_c \rightarrow \text{Raf} [\text{Phosp}_1]_c$	1	Huang et al 1996
137	$\text{Raf}^* [\text{MEK}]_c \rightarrow \text{Raf}^* \text{-MEK} []_c$	0.0111	El-Masri et al 1999
138	$\text{Raf}^* \text{-MEK} []_c \rightarrow \text{Raf}^* [\text{MEK}]_c$	0.01833	El-Masri et al 1999
139	$\text{Raf}^* \text{-MEK} []_c \rightarrow \text{Raf}^* [\text{MEK-P}]_c$	3.5	El-Masri et al 1999
140	$\text{Raf}^* [\text{MEK-P}]_c \rightarrow \text{Raf}^* \text{-MEK-P} []_c$	0.0111	El-Masri et al 1999
141	$\text{Raf}^* \text{-MEK-P} []_c \rightarrow \text{Raf}^* [\text{MEK-P}]_c$	0.01833	El-Masri et al 1999
142	$\text{Raf}^* \text{-MEK-P} []_c \rightarrow \text{Raf}^* [\text{MEK-PP}]_c$	2.9	El-Masri et al 1999
143	$[\text{MEK-PP Phosp}_2]_c \rightarrow [\text{MEK-PP-Phosp}_2]_c$	1.43×10^{-2}	Huang et al 1996
144	$[\text{MEK-PP-Phosp}_2]_c \rightarrow [\text{MEK-PP Phosp}_2]_c$	0.8	Huang et al 1996
145	$[\text{MEK-PP-Phosp}_2]_c \rightarrow [\text{MEK-P Phosp}_2]_c$	0.058	Huang et al 1996
146	$[\text{MEK-P Phosp}_2]_c \rightarrow [\text{MEK-P-Phosp}_2]_c$	2.5×10^{-4}	Huang et al 1996
147	$[\text{MEK-P-Phosp}_2]_c \rightarrow [\text{MEK-P Phosp}_2]_c$	0.5	Huang et al 1996
148	$[\text{MEK-P-Phosp}_2]_c \rightarrow [\text{MEK Phosp}_2]_c$	0.058	Huang et al 1996

Tabla 11: MEK and ERK activation (II)

Reaction	Rules	Kinetic Constant	Reference
149	$[\text{MEK-PP ERK}]_c \rightarrow [\text{MEK-PP-ERK}]_c$	1.1×10^{-4}	El-Masri et al 1999
150	$[\text{MEK-PP-ERK}]_c \rightarrow [\text{MEK-PP ERK}]_c$	0.033	El-Masri et al 1999
151	$[\text{MEK-PP-ERK}]_c \rightarrow [\text{MEK-PP ERK-P}]_c$	16	El-Masri et al 1999
152	$[\text{MEK-PP ERK-P}]_c \rightarrow [\text{MEK-PP-ERK-P}]_c$	1.1×10^{-4}	El-Masri et al 1999
153	$[\text{MEK-PP-ERK-P}]_c \rightarrow [\text{MEK-PP ERK-P}]_c$	0.033	El-Masri et al 1999
154	$[\text{MEK-PP-ERK-P}]_c \rightarrow [\text{MEK-PP ERK-PP}]_c$	5.7	El-Masri et al 1999
155	$[\text{ERK-PP Phosp}_3]_c \rightarrow [\text{ERK-PP-Phosp}_3]_c$	0.0145	Huang et al 1996
156	$[\text{ERK-PP-Phosp}_3]_c \rightarrow [\text{ERK-PP Phosp}_3]_c$	0.6	Huang et al 1996
157	$[\text{ERK-PP-Phosp}_3]_c \rightarrow [\text{ERK-P Phosp}_3]_c$	0.27	Huang et al 1996
158	$[\text{ERK-P Phosp}_3]_c \rightarrow [\text{ERK-P-Phosp}_3]_c$	0.005	Huang et al 1996
159	$[\text{ERK-P-Phosp}_3]_c \rightarrow [\text{ERK-P Phosp}_3]_c$	0.5	Huang et al 1996
160	$[\text{ERK-P-Phosp}_3]_c \rightarrow [\text{ERK Phosp}_3]_c$	0.3	Huang et al 1996

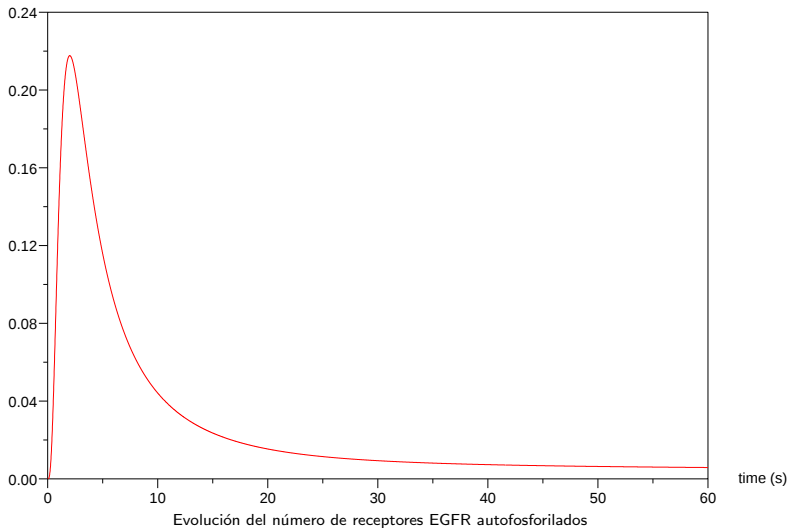
Resultados

Primer experimento virtual en el modelo

- En un escenario “normal” (condiciones basales de receptores EGFR y ligandos EGF), vamos a analizar:
 - ★ La evolución del número de **receptores EGFR** autofosforilados.
 - ★ La evolución del número de **proteínas MEK** fosforiladas.

Molecules (nM)

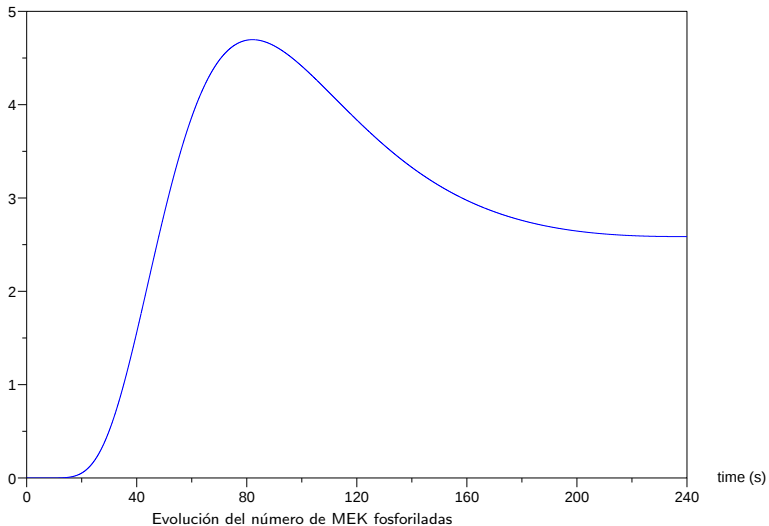
Receptor Autophosphorylation



La activación del receptor es muy rápida alcanzando su máximo hacia los 5 s.

Molecules (nM)

MEK phosphorylation



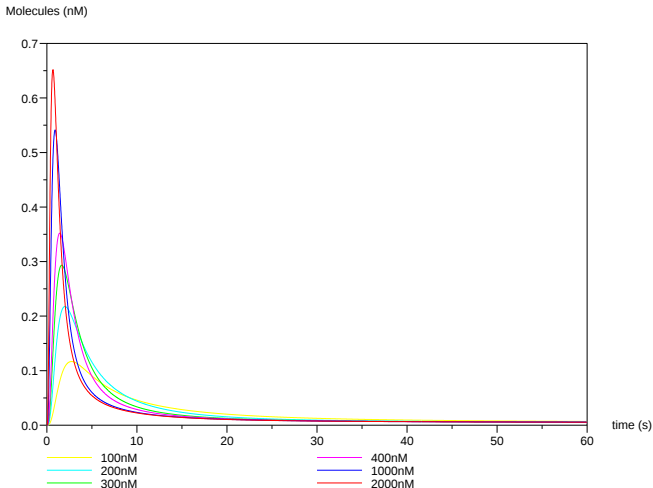
El número de MEK fosforiladas se estabiliza en torno a los 3nM.

En muchos tumores cancerígenos se han detectado altos niveles de expresión de ligandos EGF en el entorno celular y de receptores EGFR en la membrana celular.

Segundo experimento virtual en el modelo

- En un escenario de variación de las concentraciones de ligandos EGF en la superficie extracelular, vamos a analizar la sensibilidad de:
 - ★ La autofosforilación de los **receptores EGFR**.
 - ★ La fosforilación de las **proteínas Ras**.
 - ★ La fosforilación de las **proteínas MEK**.

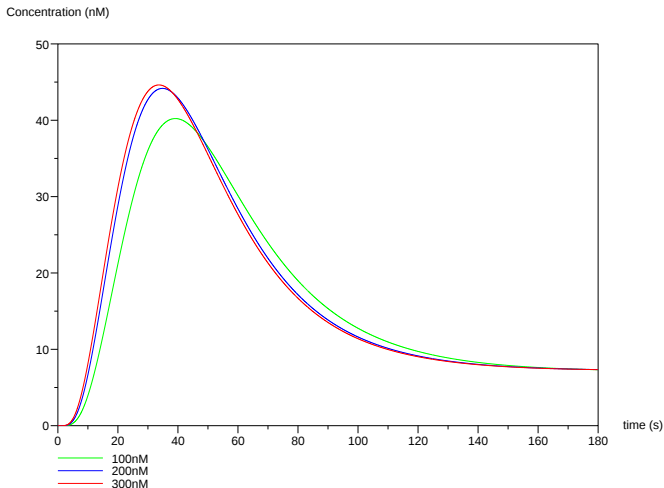
Para ello, se analizará la evolución de las fosfoliraciones cuando las concentraciones de ligandos EGF en la superficie extracelular varían en un cierto rango.



Evolución de la autofosforilación del EGFR para diferentes concentraciones de EGF

La autofosforilación del **EGFR** **sí depende de las concentraciones** de ligandos EGF: alcanzan un pico en torno a los 5 s. y después decaen rápidamente.

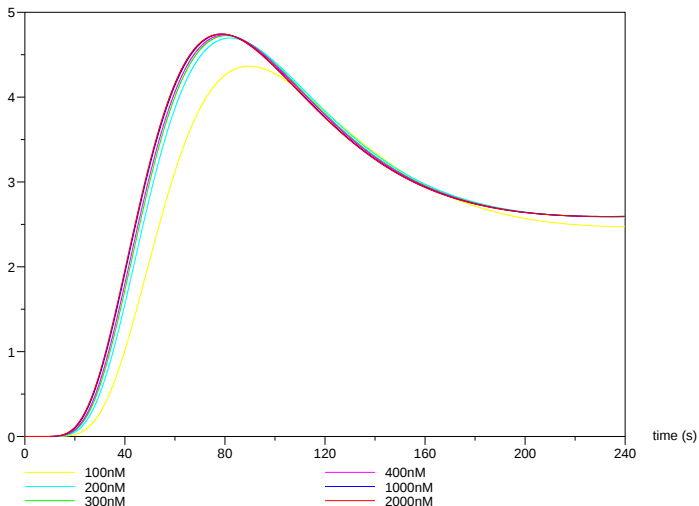
- ★ Todo parece indicar que la variación de la concentración de EGF en la superficie extracelular propiciará diferentes respuestas celulares (en términos de producción de proteínas tipo Ras o MEK).



Evolución del número de moléculas de la proteína Ras para diferentes concentraciones de EGF

La fosforilación de la proteína Ras **no depende de las concentraciones** de ligandos EGF: se estabiliza a partir de los 120 s (~ 10 nM).

Molecules (nM)



Evolución de la fosforilación del MEK para diferentes concentraciones de EGF

La fosforilación de la proteína MEK **no depende de las concentraciones** de ligandos EGF: se estabiliza a partir de los 100 s (~ 3 nM).

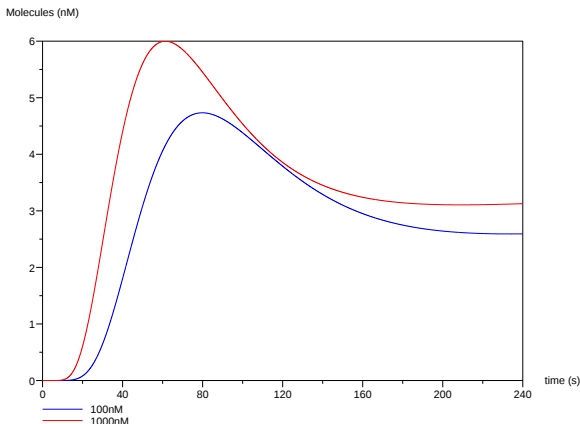
En resumen:

- * La perturbación de los niveles de ligandos en el entorno **sí** tiene impacto en la activación de los receptores EGFR pero no lo tiene en la activación de las proteínas Ras y MEK.
- * **Robustez** de la cascada de señales en relación con la concentración de ligandos en el entorno:
 - A partir de los 100-120 s. aproximadamente, la respuesta del sistema se mantiene casi constante.
 - El sistema responderá atenuando una sobreexpresión de EGF, o bien amplificando una baja concentración de EGF, a fin de garantizar una producción de aproxim. 10 nM Ras y 3nM MEK.
 - Parece ser que:
 - ★ La **internalización del receptor** produce una señal de atenuación en respuesta a una sobreexpresión de EGF.
 - ★ Varios nodos de la ruta señalizadora con **camino cruzados** producen una señal de amplificación en respuesta a una baja concentración de EGF.

Tercer experimento virtual en el modelo

- En un escenario de variación de las concentraciones de los receptores EGFR en la membrana celular, se analiza la sensibilidad de la fosforilación de las proteínas

ME



Evolución de la fosforilación del MEK para diferentes concentraciones de EGFR

El número de MEK fosforiladas **sí depende de las concentraciones** de los receptores EGFR.

En resumen:

- * La perturbación de los niveles de receptores EGFR en la superficie celular sí tiene impacto en la activación de la proteína MEK.
- * Más concretamente, el número de MEK fosforiladas aumenta con la concentración de los receptores EGFR.
- * Una consecuencia de una alta activación de la proteína MEK es un proceso incontrolado de proliferación celular.

Los resultados obtenidos en los tres experimentos virtuales coinciden con los resultados experimentales obtenidos en laboratorios.

Así pues, la sobreexpresión de los receptores EGFR puede jugar un papel relevante en el crecimiento incontrolado de tumores cancerígenos.

De esta forma, el receptor EGFR se convierte en un objetivo importante para el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

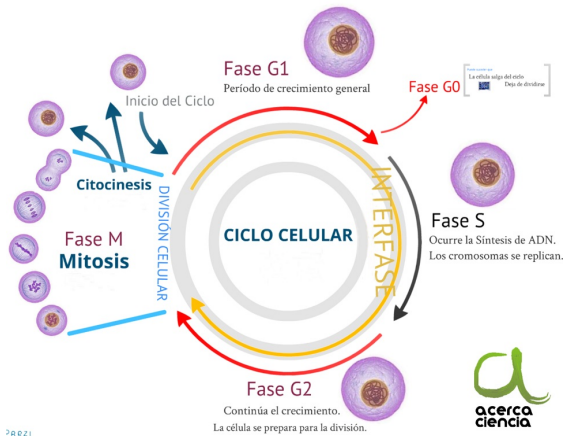
Existen diferentes estrategias para inhibir la sobreexpresión del receptor EGFR sobre la superficie celular.

- ★ El desarrollo de un **anticuerpo monoclonal** que enlaza al **dominio extracelular** del receptor compitiendo con su ligando natural (EGF).
- ★ El uso de **moléculas de bajo peso molecular** que inhibe la actividad quinasa-tirosina del receptor EGFR a **nivel intracelular**.

Simulación computacional para la experimentación virtual

- * Traducción del modelo a SBML (*System Biology Markup Language*)
- * Interfaz para la implementación de CLIPS usando JAVA.
- * Semántica basada en el algoritmo determinista de tiempo de espera (usando **Infobiotics Workbench**).

(b) Rutas señaladoras apoptóticas mediatizadas por la proteína FAS



Durante el ciclo celular se determina si la célula debe entrar en un proceso de autodestrucción o si debe continuar el ciclo.

Inmunología

Estudia los mecanismos por los cuales los animales pueden:

- * **Diferenciar** su propia estructura de la ajena.
- * **Reaccionar** contra lo que reconocen como “extraño”.
- * En algunos casos, **memorizarlo** para reaccionar de modo más eficaz en el futuro.

Inmunidad (del latín, *inmunitas*): protección frente a enfermedades infecciosas.

Sistema inmunitario: células y moléculas responsables de la inmunidad (pueden localizarse en fluidos fisiológicos, en tejidos y en órganos).

Respuesta inmune: respuesta colectiva y coordinada frente a lo que el S.I. reconoce como una sustancia extraña al organismo (**antígeno**).

Ante una infección, las células del sistema inmune encargadas de frenar la agresión, proliferarán. Una vez controlada la infección, buena parte de esas células deberán ser eliminadas.

Homeostasis celular

Vida media de las células de un organismo vivo: depende del tipo de célula.

- ★ **Largo** periodo de vida: células musculares, neuronas, etc.
- ★ Periodo **corto** de vida: células sanguíneas, epiteliales, etc.

El número de células que componen un tejido (en un organismo adulto) debe permanecer (aproximadamente) constante.

- ★ Ése es el objetivo de la **homeostasis celular**.
- ★ Equilibrio entre la **proliferación celular** y la **muerte celular**.

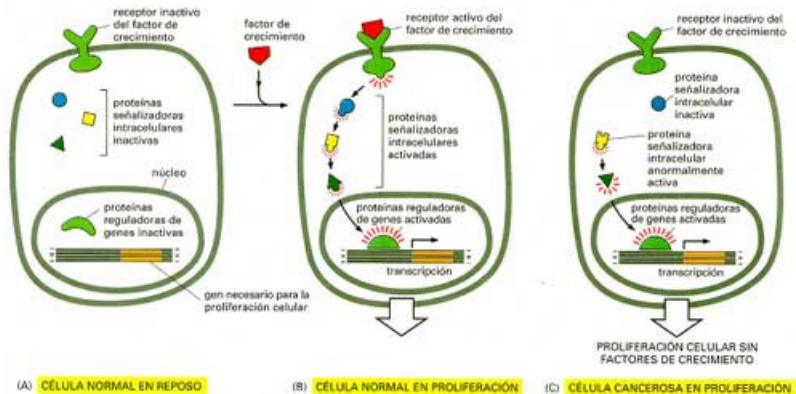
Cuando hay desequilibrio:

- ★ Incremento en la proliferación: **cáncer** u otras enfermedades.
- ★ Incremento en la muerte celular: enfermedades **neurodegenerativas**.

Estado normal de un organismo:

- ★ Respuestas celulares que permiten a las células y a los tejidos adaptarse y sobrevivir en las condiciones de su entorno.

Proliferación celular



Necrosis versus apoptosis

Existen, básicamente, dos mecanismos de **muerte celular**:

- ★ **Necrosis**.

- Producida por heridas, lesiones, senectud, etc.

- ★ **Apoptosis**³.

- Provocada (“programada”) por la propia célula (etimológicamente: evoca la caída de las hojas en otoño o los pétalos de las flores).

En cierto sentido, la apoptosis es la antítesis de la mitosis (es necesario un equilibrio entre la apoptosis y la mitosis).

³

J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal Cancer**, 26 (1972), 239

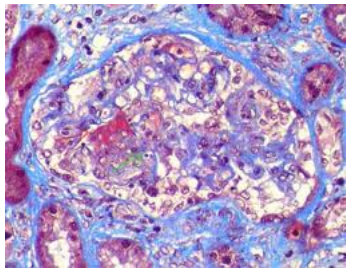
Cómo se produce la muerte celular por necrosis

Se trata de una muerte algo mugrienta.

- ★ Aparecen **disfunciones** en los orgánulos celulares.
- ★ **Ausencia** de condensación del contenido celular.
- ★ **Incremento brusco** de la concentración de **Calcio libre** en el citoplasma.
- ★ **Degradación del ADN** por la acción de las endonucleasas.
- ★ **Rotura** de la membrana plasmática.
- ★ **Alteración** de aspectos funcionales de la **mitocondria**.
- ★ Se produce una marcada **inflamación**.

Este proceso puede conducir a la muerte de células vecinas.

Necrosis



Apoptosis

Se trata de una muerte relativamente “limpia”.

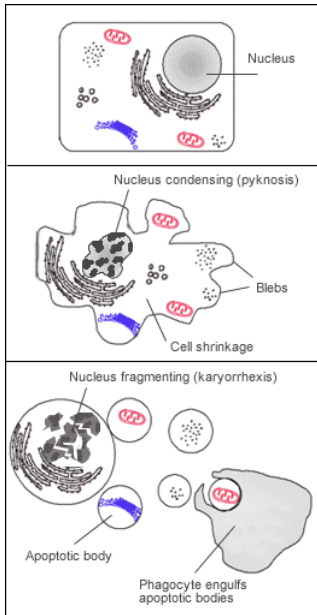
- ★ Objetivo: eliminar células que ya no son necesarias.
- ★ Mecanismo necesario para el correcto funcionamiento de un ser vivo.
- ★ Aparece en las etapas del desarrollo donde se producen células en exceso.
- ★ Puede ser una respuesta del organismo ante disfunciones graves.
- ★ Juega un papel esencial en la **homeostasis celular**.
- ★ Es conveniente que la muerte sea:
 - Rápida, efectiva y limpia (la célula muerta es **absorbida**).

Con el conocimiento de la apoptosis:

- * El cáncer pasó de ser una enfermedad con alteración en la **proliferación celular** a una con desequilibrio entre la **proliferación** y la **apoptosis**.
- * Papel crucial en **enfermedades neurodegenerativas** (Parkinson, Alzheimer, etc.) y en el **SIDA**, entre otras relevantes.

Cómo se produce la muerte celular por apoptosis

- ★ Reducción del tamaño celular.
- ★ Aumento brusco de la densidad intracelular.
- ★ Condensación del citoplasma.
- ★ Incremento moderado de la concentración de Calcio libre en el citoplasma.
- ★ Fragmentación del ADN (por la acción de unas endonucleasas).
- ★ Alteración de aspectos funcionales de la mitocondria.
- ★ Pérdida de **contacto/adhesión** con las células vecinas (alteración en las moléculas de adhesión de la membrana plasmática).
- ★ Compactación del material genético en el núcleo y segregación hacia la membrana nuclear donde se forman unos parches.
- ★ Formación de **cuerpos apoptóticos** que serán fagocitados por células vecinas.
- ★ No se rompe la membrana plasmática.
- ★ No se produce inflamación.



Activación de la apoptosis

La activación se puede realizar a través de:

- ★ Una **inducción negativa**:

- ★ Inhibición de una actividad supresora.
- ★ Falta de factores de crecimiento.
- ★ Disminución de la adherencia con células vecinas.

- ★ Una **inducción positiva**:

- ★ La unión de un ligando a un receptor (**FAS**/TNF/NGF, etc.).
- ★ Recepción de señales conflictivas.

Nos centraremos en rutas que activan las señales (por contacto) mediante la formación de un complejo **ligando/receptor**.

Rutas señalizadoras apoptóticas mediatizadas por la proteína FAS

Actores principales de las rutas señalizadoras objeto de estudio:

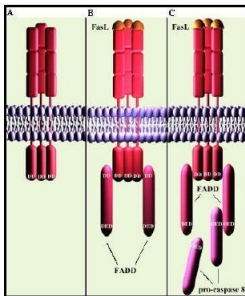
- ★ El ligando y el receptor asociado a la proteína **FAS**: **FASL** y **FASR**, respectivamente
- ★ La familia de las **caspasas**.
- ★ La **mitocondria**.
- ★ La familia de las **Bcl2**.

La proteína FAS

Elemento esencial de la familia de **receptores de muerte** (**FAS**, CD95 o APO-1).

El receptor de la proteína FAS (**FASR**) consta de **tres subunidades** idénticas tales que poseen:

- ★ Una **región extracelular**.
- ★ Un **dominio transmembrana** sobre la membrana plásmica.
- ★ Una **región intracelular** (que contiene un dominio de muerte DD).



- Receptor de muerte que unen a un dominio de muerte intracelular.
- Molécula adaptadora con dominio de muerte: FADD

El proceso comenzará con la unión del ligando **FASL** al receptor **FASR**.

Las caspasas

Es una familia de proteínas que controla los cambios estructurales que se producen por la transmisión de señales.

Existen **caspasas** de varios tipos:

★ Caspasas **inductoras/iniciadoras** (**dan la orden**): **8-9-10**.

- Poseen dominios efectores de muerte (DED) y dominios de activación y reclutamiento de caspasas (CARD).

★ Caspasas **efectoras/ejecutoras** (**ejecutan la orden**): **3-6-7**.

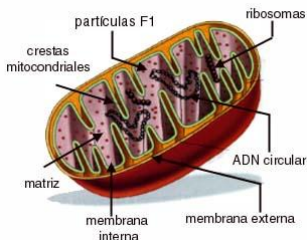
- Son activadas por las caspasas iniciadoras.
- No contienen dominios DED ni CARD.
- Eliminan sustratos celulares necesarios para la supervivencia.

Una mala regulación de las caspasas puede repercutir gravemente en los procesos apoptóticos.

La mitocondria

Es mucho más que una fábrica de producción de energía para la célula.

Cuando una célula recibe una señal de muerte, debe decidir si desencadena el proceso, o bien opta por la supervivencia. En esa fase de decisión, la mitocondria juega un papel fundamental.



Contiene muchas proteínas pro-apoptóticas.

- El **citocromo c** (transportador de electrones) : participa en la activación de la caspasa 9.
- El **Smac DIABLO**: inhibe la acción de ciertos miembros de la familia antiapoptótica IAP (proteínas inhibidoras de la apoptosis) .

La función apoptótica se implementa cuando esas proteínas son “liberadas” al citosol.

La familia Bcl2

Familia de proteínas Bcl2:

- Reguladores del proceso apoptótico.
- Controlan la salida del **citocromo c** y del **Smac DIABLO** de la mitocondria.

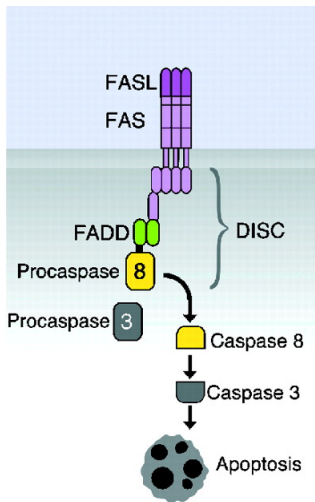
La activación de proteínas pro-apoptóticas de Bcl2 producen un poro en la membrana externa de la mitocondria, propiciando la liberación de proteínas al **citosol**

Los miembros de la familia Bcl2 se pasan el tiempo *controlándose* unos a otros.

- Miembros con función anti-apoptótica: Bcl2 y Bcl-xL.
- Miembros con función apoptótica: Bax y Bak por una parte y Bid, tBid y Bad por otra.

El destino de una célula (muerte o supervivencia) está determinada por las diferencias de expresión entre las distintas proteínas de la familia Bcl2.

Comienzo de la apoptosis mediatizada por FAS ...



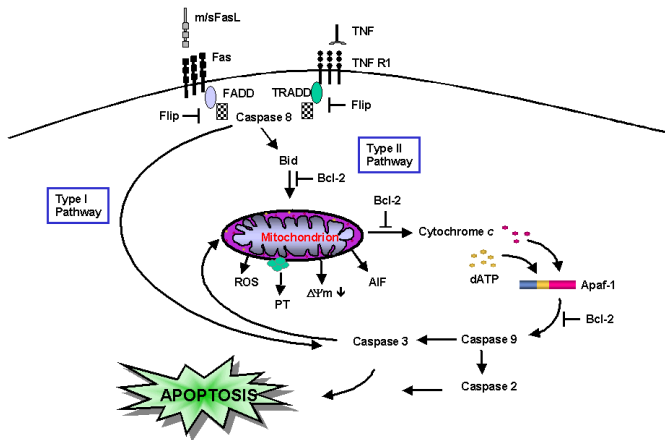
Comienzo de la apoptosis mediatizada por FAS ...

El ligando **FASL** enlaza con el receptor **FASR**, a través del dominio extracelular.

- ★ El complejo **FASL-FASR** produce la activación de **FASR** por trimerización.
- ★ La activación del receptor provoca varias acciones:
 - Forma el complejo de señalización inductor de muerte (DISC).
 - Recluta moléculas adaptadoras (FADD que posee un dominio DED).
- ★ El DED de FADD interactúa con el DD de FASR reclutando la **procaspasa 8**.
- ★ La procaspasa 8 se escinde y libera la cas**pasa 8** del DISC al citosol.
- ★ La caspasa 8 actuará como detonante de la activación de la cas**pasa 3**, lo cual se puede implementar mediante dos caminos diferentes⁴:
 - **Tipo I**: vía extrínseca o camino de los receptores de muerte.
 - **Tipo II**: vía intrínseca o mitocondrial.
- ★ Ambos caminos divergen tras la activación de la caspasa 8 y convergen tras la activación de la caspasa 3.

⁴ C. Scaffidi, S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M., Debatin, P.H. Krammer, M.E.

Apoptosis mediatizada por FAS



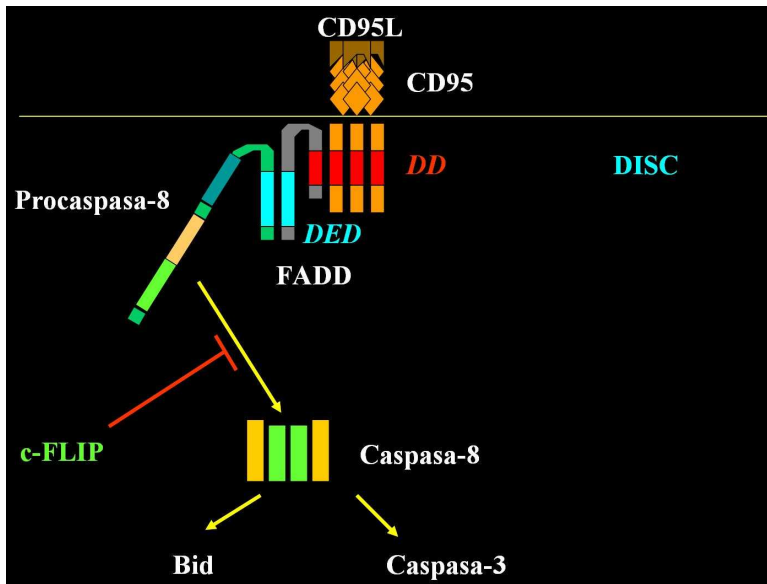
Vía **extrínseca** o de los receptores de muerte: **Tipo I**

Una vez activada la caspasa 8 (iniciadora de la apoptosis):

- Se adhiere directamente a la **procaspasa 3**.
- La procaspasa 3 provoca directamente la activación de la **caspasa 3**.
- Finalmente, la caspasa 3 activada provoca la muerte celular programada.

Esta ruta puede ser inhibida mediante proteínas de la familia FLIP (que contienen dos dominios DED y se unen al complejo FASR-FADD).

Vía **extrínseca** o de los receptores de muerte: **Tipo I**



Vía **intrínseca** o **mitocondrial**: **Tipo II**

Además de ser una fábrica de energía, La **mitocondria** suele “secuestrar” a algunas proteínas apoptóticas (entre ellas el **citocromo c** y el **Smac DIABLO**).

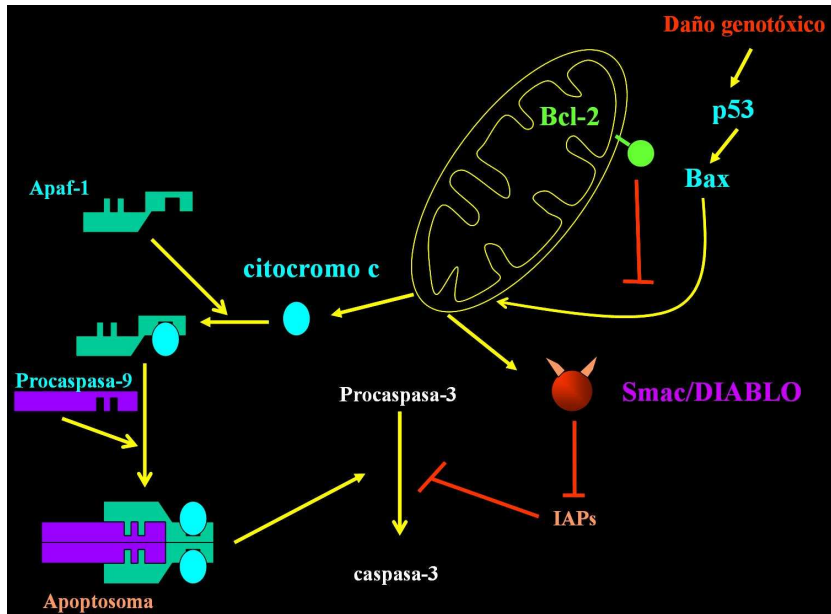
Esta vía se produce, básicamente, por daño en el citosol o en el núcleo (que activa Bax).

- La caspasa 8 provoca una escisión en la proteína Bid que, junto a la proteína Bax activada, producen unos poros en la membrana mitocondrial, propiciando la liberación del citocromo c y del Smac DIABLO.
- El citocromo c enlaza con la proteína Apaf-1 (que es una molécula apoptótica efectora).
- El nuevo complejo recluta a la procaspasa 9 formando otro complejo que, con ayuda del nucleótido ATP (energía), forma un apoptosoma.
- Este apoptosoma se adhiere a la procaspasa 3 provocando la activación de la caspasa 3.
- Finalmente, la caspasa 3 activada provoca la muerte celular programada.

Existen una serie de proteínas (IAPs, XIPAs, etc.) capaces de inhibir a las caspasas efectoras. Su antídoto es la proteína Smac DIABLO.

El Smac-DIABLO liberado al citosol es capaz de inducir apoptosis (mediante un mecanismo que se desconoce).

Vía **intrínseca** o mitocondrial: **Tipo II**



Apoptosis mediatizada por FAS: modelo basado en sistemas de EDOs

988

EXPERIMENTAL AND MODELING STUDY OF Fas APOPTOSIS PATHWAY

Table 1. *Biochemical reactions*

Reactant A*	Reactant B	Reactant C	Forward Reaction Rate	Reverse Reaction Rate	Comment
FasL FasC	Fas FADD	FasC FasC:FADD	k1_f k2_f	k1_r k2_r	Assume noncooperative binding between FADD and Fas, which means that regardless of other molecules in the complex, the FADD-Fas interaction always has the same rate constant.
FasC:FADD	FADD	FasC:FADD_2	k2_f	k2_r	
FasC:FADD_2	FADD	FasC:FADD_3	k2_f	k2_r	
FasC:FADD_2:Casp8	FADD	FasC:FADD_3:Casp8	k2_f	k2_r	
FasC:FADD_2:FLIP	FADD	FasC:FADD_3:FLIP	k2_f	k2_r	
FasC:FADD_2:Casp8_2	FADD	FasC:FADD_3:Casp8_2	k2_f	k2_r	
FasC:FADD_2:Casp8:FLIP	FADD	FasC:FADD_3:Casp8:FLIP	k2_f	k2_r	Assume caspase-8 and FLIP have the same binding rate constants for FADD, because their death effector domains (FADD binding domain) have high homology (38).
FasC:FADD_2:FLIP_2	FADD	FasC:FADD_3:FLIP_2	k2_f	k2_r	
FasC:FADD:Casp8	FADD	FasC:FADD_2:Casp8	k2_f	k2_r	
FasC:FADD:FLIP	FADD	FasC:FADD_2:FLIP	k2_f	k2_r	
FasC:FADD_3	Casp8	FasC:FADD_3:Casp8	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_3	FLIP	FasC:FADD_3:FLIP	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_3:Casp8	Casp8	FasC:FADD_3:Casp8_2	k3_f	k3_r	Similar to binding between FADD and Fas, assume noncooperative binding between FADD and caspase-8 and between FADD and FLIP.
FasC:FADD_3:Casp8	FLIP	FasC:FADD_3:Casp8:FLIP	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_3:FLIP	Casp8	FasC:FADD_3:Casp8:FLIP	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_3:FLIP	FLIP	FasC:FADD_3:FLIP_2	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_3:Casp8_2	Casp8	FasC:FADD_3:Casp8_3	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_3:Casp8_2	FLIP	FasC:FADD_3:Casp8_2:FLIP	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_3:Casp8:FLIP	Casp8	FasC:FADD_3:Casp8_2:FLIP	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_3:Casp8:FLIP	FLIP	FasC:FADD_3:Casp8:FLIP_2	k3_f	k3_r	
FasC:FADD3:FLIP_2	Casp8	FasC:FADD_3:Casp8:FLIP_2	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_3:FLIP_2	FLIP	FasC:FADD_3:FLIP_3	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_2	Casp8	FasC:FADD_2:Casp8	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_2	FLIP	FasC:FADD_2:FLIP	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_2:Casp8	Casp8	FasC:FADD_2:Casp8_2	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_2:Casp8	FLIP	FasC:FADD_2:Casp8:FLIP	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_2:FLIP	Casp8	FasC:FADD_2:Casp8:FLIP	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_2:FLIP	FLIP	FasC:FADD_2:FLIP_2	k3_f	k3_r	
FasC:FADD	Casp8	FasC:FADD:Casp8	k3_f	k3_r	
FasC:FADD	FLIP	FasC:FADD:FLIP	k3_f	k3_r	
FasC:FADD_2	Casp8_2_p41	FasC:FADD_2:Casp8_2	k4		
FasC:FADD_3:Casp8	Casp8_2_p41	FasC:FADD_3:Casp8_3	k4		
FasC:FADD_3:FLIP	Casp8_2_p41	FasC:FADD_3:Casp8_2:FLIP	k4		
FasC:FADD_3	Casp8_2_p41	FasC:FADD_3:Casp8_2	k4		
Casp8_2_p41		Casp8_2*	k5		
Casp8_2*					
Casp8_2*	Casp3	Casp8_2*:Casp3	k6_f	k6_r	Nongeneral reaction: $A \rightarrow A^*$
Casp8_2*	Casp3*	Casp8_2*:Casp3		k7	

Table I. Continued

Reactant A ^a	Reactant B	Reactant C	Forward Reaction Rate	Reverse Reaction Rate	Comment
Casp9*	Casp3*	Casp9*:Casp3		k17	
Casp9	XIAP	Casp9:XIAP	k18_f	k18_r	
Casp3*	XIAP	Casp3*:XIAP	k19_f	k19_r	
Equations used for different models					
Bcl_2 binding to Bax alone					
Bcl_2	Bax	Bcl2:Bax	k20_f	k20_r	
Bcl_2 binding to Bid alone					
Bcl_2	Bid	Bcl2:Bid	k20_f	k20_r	
Bcl_2 binding to tBid alone					
Bcl_2	tBid	Bcl2:tBid	k20_f	k20_r	
Bcl_2 binding to both tBid and Bax					
Bcl_2	Bax	Bcl2:Bax	k20_f	k20_r	
Bcl_2	tBid	Bcl2:tBid	k20_f	k20_r	

^a General reaction: $A + B \xrightleftharpoons[k_r]{k_f} C$

Bid gives results similar to those observed when Bcl-2 binds to Bax alone (data not shown). These simulation results indicate that the kinetic profile of caspase-3 activation in a cell line in which Bcl-2 is overexpressed could be used to distinguish between the four hypotheses about the mechanism of action of Bcl-2. Although Bcl-2 overexpression has been shown to protect Jurkat cells from Fas-induced apoptosis (6), the effect of Bcl-2 overexpression, especially different amounts of Bcl-2 overexpression, on the kinetics of caspase-3 activation in Jurkat cells has not been quantitatively measured. Therefore, we generated a stable, Bcl-2-overexpressing Jurkat cell line. In agreement with prior studies, Bcl-2 overexpression reduced the degree of apoptosis following stimulation by FasL (Fig. 5A). Intracellular staining for Bcl-2 shows a wide range of Bcl-2 up-regulation in the cell lines transduced with the MIG-Bcl-2 vector (wider peak) compared with a relatively uniform expression level (narrower peak) for the control cell line infected with the empty MIG vector (Fig. 5B). This wide range of Bcl-2 up-regulation allowed us to isolate subpopulations of cells with low and high levels of Bcl-2 overex-

pression. Using Bcl-2 and active caspase-3 double intracellular staining, kinetics of caspase-3 activation following stimulation with 100 ng/ml FasL was measured in these two subpopulations. Fig. 5C shows one representative experiment of three. The low Bcl-2 overexpressing subpopulation (mean fluorescence intensity, 74.4) had a mean intensity ~6 times that of the control cell line (mean fluorescence intensity, 12.6), whereas the high Bcl-2 overexpressing subpopulation (mean fluorescence intensity, 508) had a mean intensity ~50 times that of the control cell line (Fig. 5B). Caspase-3 activation is slowed in both subpopulations compared with control cells (Fig. 5C). In addition, there is neither a significant difference in the kinetics of caspase-3 activation between these two subpopulations, nor between them and the total heterogeneous Bcl-2-overexpressing population (Fig. 5C). These results show that a 6-fold increase of Bcl-2 expression is sufficient to reach a maximum level of inhibition. The residual caspase-3 activation is likely due to activation through the type I pathway. Comparison of these experimental results with simulation results from the four models (Fig. 4, B–E) supports the hypothesis that

Apoptosis mediatizada por FAS: modelo basado en sistemas de EDOs

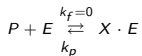
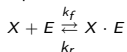
- * **Reacciones generales:** $A + B \xrightleftharpoons[k_r]{k_f} C$, siendo k_f y k_r constantes (forward rate and reverse rate).

Las variaciones de las concentraciones de las moléculas a lo largo del tiempo se modelizan como sigue:

$$\frac{dA}{dt} = \frac{dB}{dt} = -\frac{dC}{dt} = k_f \cdot A \cdot B - k_r \cdot C$$

- * **Reacciones enzimáticas:** $X + E \xrightleftharpoons[k_r]{k_f} X \cdot E \xrightarrow{k_p} P + E$ (X una molécula, E una enzima y P un producto).

Estas reacciones se descomponen en dos del tipo anterior:



- * **Reacciones de transporte** (para liberar el **Smac** y el **citocromo c**: dependen de la concentración del **Bax**):



en donde A es la concentración del Smac o del citocromo c en la mitocondria y A^* es la concentración en el citosol; por su parte B es la concentración del Bax.

Modelo de la apoptosis mediatizada por FAS (I)

En⁵ se da un modelo basado en ODEs para unas **rutas señalizadoras de proteínas** relacionadas con la apoptosis mediatizada por FAS.

Los resultados deducidos a partir de ese modelo, son compatibles con los resultados experimentales obtenidos en el laboratorio.

Se trata de presentar un modelo basado en **sistemas P multicompartimentales** para las **mismas rutas** señalizadoras.

⁵

F. Hua, M.G. Cornejo, M.H. Cardone, C.L. Stokes, D.A. Lauffenburger. Effects of Bcl-2 Levels on FAS Signaling-Induced Caspase-3 Activation: Molecular Genetic Tests of Computational Model Predictions. **The Journal of Immunology**, **175**, 2 (July 2005), 985–995.

Modelo de la apoptosis mediatizada por FAS (II) ⁶

Sistema P multicompartimental con un entorno que contiene un sistema P

- Semántica: *algoritmo determinista de tiempo de espera*.

El sistema P consta de 53 proteínas y 99 reacciones químicas

$$\Pi_{FAS} = (\Gamma, \{e, s, c, m\}, \mu, (\mathcal{M}_e, \mathcal{M}_s, \mathcal{M}_c, \mathcal{M}_m), (\mathcal{R}_e, \mathcal{R}_s, \mathcal{R}_c, \mathcal{R}_m))$$

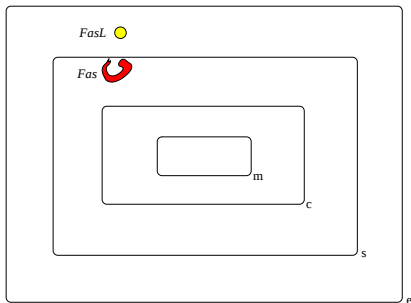
- * **Alfabeto**: Representa todas las proteínas que intervienen en la cascada

Object	Protein or Complex
FASR	Fas receptor
FASL	Fas Ligand
FADD	Fas–associating protein with death domain
⋮	⋮
Apaf	Apoptotic protease activating factor
Smac	Second mitochondria–derived activator of caspase
XIAP	X–linked inhibitor of apoptosis protein

⁶ S. Cheruku, A. Păun, F.J. Romero, M.J. Pérez-Jiménez, O.H. Ibarra. Simulating FAS-induced apoptosis by using P systems. *Progress in Natural Science* 17, 4 (2007), 424–431.

$\Gamma = \{ \text{FASL, FASR, FASC, FADD, FASC-FADD, FASC-FADD}_2, \text{FASC-FADD}_3, \text{FASC-FADD}_2\text{-CASP8, FASC-FADD}_3\text{-CASP8, FASC-FADD}_2\text{-FLIP, FASC-FADD}_3\text{-FLIP, FASC-FADD}_2\text{-CASP8}_2, \text{FASC-FADD}_3\text{-CASP8}_2, \text{FASC-FADD}_2\text{-CASP8-FLIP, FASC-FADD}_3\text{-CASP8-FLIP, FASC-FADD}_2\text{-FLIP}_2, \text{FASC-FADD}_3\text{-FLIP}_2, \text{FASC-FADD-CASP8, FASC-FADD-FLIP, CASP8, FLIP, FASC-FADD}_3\text{-CASP8}_3, \text{FASC-FADD}_3\text{-CASP8}_2\text{-FLIP, FASC-FADD}_3\text{-CASP8-FLIP}_2, \text{FASC-FADD}_3\text{-FLIP}_3, \text{CASP8}_2^{P41}, \text{CASP8}_2^*, \text{CASP3, CASP8}_2^*\text{-CASP3, CASP3}^*, \text{CASP8}_2^*\text{-Bid, tBid, Bid, Bax, tBid-Bax, tBid-Bax}_2, \text{Smac, Smac}^*, \text{Cyto.c, Cyto.c}^*, \text{XIAP, Smac}^*\text{-XIAP, Apaf, Cyto.c}^*\text{-Apaf-ATP, CASP9, Cyto.c}^*\text{-Apaf-ATP-CASP9, Cyto.c}^*\text{-Apaf-ATP-CASP9}_2, \text{CASP9}^*, \text{CASP9}^*\text{-CASP3, CASP9-XIAP, CASP3}^*\text{-XIAP, Bcl2, Bcl2-Bax} \}.$

Estructura de membranas: Árbol de una sóla rama y 4 nodos (etiquetas *e*, *s*, *m* y *c*).



El modelo es un sistema multicompartimental con 1 entorno y 1 sistema P de grado 4.

Relaciones entre la célula real y el sistema P que lo modeliza:

- Entorno real $\longrightarrow$ Piel del sistema P, etiquetada por *e*.
- Membrana plásmica $\longrightarrow$ Hija de la piel, etiquetado por *s*.
- Citoplasma de la célula $\longrightarrow$ Nieta de la piel, etiquetado por *c*.
- Mitocondria de la célula $\longrightarrow$ Bisnieta de la piel, etiquetado por *m*.

Multiconjuntos iniciales: Número de moléculas en cada región (Estimaciones empíricas)

$$\mathcal{M}_e = \{FASL^{12500}\}$$

$$\mathcal{M}_s = \{FASR^{6023}\}$$

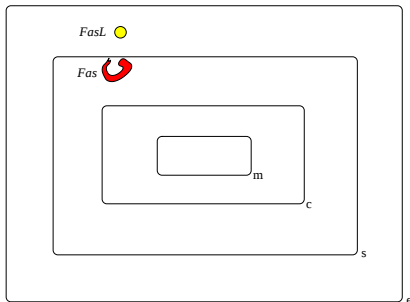
$$\mathcal{M}_c = \{FADD^{10040}, CASP8^{20074}, FLIP^{48786}, CASP3^{120460}, Bid^{15057}, Bax^{50189}, XIAP^{18069}, Apaf^{60230}, CASP9^{12046}\}$$

$$\mathcal{M}_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{45172}\}$$

Reglas: Se modelizan 99 reacciones químicas que constituyen la cascada.

- * Un ejemplo: $FASL [FASR]_s \rightarrow [FASC]_s, c_{r_1}$
- * El objeto *FASL* en el entorno y el objeto *FASR* en la membrana *s* se transforman en el complejo *FASC*, y tiene asociado una constante estocástica que mide la afinidad entre ligando y receptor.
- * El tiempo de espera asociado a esa regla es:

$$\tau_{r_1} = \frac{1}{c_{r_1} \cdot |FASL| \cdot |FASR|}$$



label	rule	rate
r_1	$FASL[FASR]_s \rightarrow [FASC]_s$	k_{1f}
r_2	$[FASC]_s \rightarrow FASL[FASC]_s$	k_{1r}
r_3	$FASC[FADD]_c \rightarrow FASC:FADD[]_c$	k_{2f}
r_4	$FASC:FADD[]_c \rightarrow FASC[FADD]_c$	k_{2r}
r_5	$FASC:FADD[FADD]_c \rightarrow FASC:FADD_2[]_c$	k_{2f}
r_6	$FASC:FADD_2[]_c \rightarrow FASC:FADD[FADD]_c$	k_{2r}
r_7	$FASC:FADD_2[FADD]_c \rightarrow FASC:FADD_3[]_c$	k_{2f}
r_8	$FASC:FADD_3[]_c \rightarrow FASC:FADD_2[FADD]_c$	k_{2r}
r_9	$FASC:FADD_2:CASP8[FADD]_c \rightarrow FASC:FADD_3:CASP8[]_c$	k_{2f}
r_{10}	$FASC:FADD_3:CASP8[]_c \rightarrow FASC:FADD_2:CASP8[FADD]_c$	k_{2r}
r_{11}	$FASC:FADD_2:FLIP[FADD]_c \rightarrow FASC:FADD_3:FLIP[]_c$	k_{2f}
r_{12}	$FASC:FADD_3:FLIP[]_c \rightarrow FASC:FADD_2:FLIP[FADD]_c$	k_{2r}
r_{13}	$FASC:FADD_2:CASP8_2[FADD]_c \rightarrow FASC:FADD_3:CASP8_2[]_c$	k_{2f}
r_{14}	$FASC:FADD_3:CASP8_2[]_c \rightarrow FASC:FADD_2:CASP8_2[FADD]_c$	k_{2r}
r_{15}	$FASC:FADD_2:CASP8:FLIP[FADD]_c \rightarrow FASC:FADD_3:CASP8:FLIP[]_c$	k_{2f}
r_{16}	$FASC:FADD_3:CASP8:FLIP[]_c \rightarrow FASC:FADD_2:CASP8:FLIP[FADD]_c$	k_{2r}
r_{17}	$FASC:FADD_2:FLIP_2[FADD]_c \rightarrow FASC:FADD_3:FLIP_2[]_c$	k_{2f}
r_{18}	$FASC:FADD_3:FLIP_2[]_c \rightarrow FASC:FADD_2:FLIP_2[FADD]_c$	k_{2r}
r_{19}	$FASC:FADD:CASP8[FADD]_c \rightarrow FASC:FADD_2:CASP8[]_c$	k_{2f}
r_{20}	$FASC:FADD_2:CASP8[]_c \rightarrow FASC:FADD:CASP8[FADD]_c$	k_{2r}
r_{21}	$FASC:FADD:FLIP[FADD]_c \rightarrow FASC:FADD_2:FLIP[]_c$	k_{2f}
r_{22}	$FASC:FADD_2:FLIP[]_c \rightarrow FASC:FADD:FLIP[FADD]_c$	k_{2r}
r_{23}	$FASC:FADD_3:CASP8[]_c \rightarrow FASC:FADD_3:CASP8[]_c$	k_{2f}
r_{24}	$FASC:FADD_3:CASP8[]_c \rightarrow FASC:FADD_3[CASP8]_c$	k_{2r}
r_{25}	$FASC:FADD_3[FLIP]_c \rightarrow FASC:FADD_3:FLIP[]_c$	k_{3f}
r_{26}	$FASC:FADD_3:FLIP[]_c \rightarrow FASC:FADD_3[FLIP]_c$	k_{3r}
r_{27}	$FASC:FADD_3:CASP8[CASP8]_c \rightarrow FASC:FADD_3:CASP8_2[]_c$	k_{3f}
r_{28}	$FASC:FADD_3:CASP8_2[]_c \rightarrow FASC:FADD_3:CASP8[CASP8]_c$	k_{3r}
r_{29}	$FASC:FADD_3:CASP8[FLIP]_c \rightarrow FASC:FADD_3:CASP8:FLIP[]_c$	k_{3f}
r_{30}	$FASC:FADD_3:CASP8:FLIP[]_c \rightarrow FASC:FADD_3:CASP8[FLIP]_c$	k_{3r}
r_{31}	$FASC:FADD_3:FLIP[CASP8]_c \rightarrow FASC:FADD_3:CASP8:FLIP[]_c$	k_{3f}
r_{32}	$FASC:FADD_3:CASP8:FLIP[]_c \rightarrow FASC:FADD_3:FLIP[CASP8]_c$	k_{3r}
r_{33}	$FASC:FADD_3:FLIP[FLIP]_c \rightarrow FASC:FADD_3:FLIP_2[]_c$	k_{3f}
r_{34}	$FASC:FADD_3:FLIP_2[]_c \rightarrow FASC:FADD_3:FLIP[FLIP]_c$	k_{3r}
r_{35}	$FASC:FADD_3:CASP8_2[CASP8]_c \rightarrow FASC:FADD_3:CASP8_3[]_c$	k_{3f}

label	rule	rate
r_{36}	$FASC : FADD_3 : CASP8_3[]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : CASP8_2[CASP8]_c$	k_{3r}
r_{37}	$FASC : FADD_3 : CASP8_2[FLIP]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : CASP8_2 : FLIP[]_c$	k_{3f}
r_{38}	$FASC : FADD_3 : CASP8_2 : FLIP[]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : CASP8_2[FLIP]_c$	k_{3r}
r_{39}	$FASC : FADD_3 : CASP8 : FLIP[CASP8]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : CASP8_2 : FLIP[]_c$	k_{3f}
r_{40}	$FASC : FADD_3 : CASP8_2 : FLIP[]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : CASP8 : FLIP[CASP8]_c$	k_{3r}
r_{41}	$FASC : FADD_3 : CASP8 : FLIP[FLIP]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : CASP8 : FLIP_2[]_c$	k_{3f}
r_{42}	$FASC : FADD_3 : CASP8 : FLIP_2[]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : CASP8 : FLIP[FLIP]_c$	k_{3r}
r_{43}	$FASC : FADD_3 : FLIP_2[CASP8]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : CASP8 : FLIP_2[]_c$	k_{3f}
r_{44}	$FASC : FADD_3 : CASP8 : FLIP_2[]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : FLIP_2[CASP8]_c$	k_{3r}
r_{45}	$FASC : FADD_3 : FLIP_2[FLIP]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : FLIP_3[]_c$	k_{3f}
r_{46}	$FASC : FADD_3 : FLIP_3[]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : FLIP_2[FLIP]_c$	k_{3r}
r_{47}	$FASC : FADD_2[CASP8]_c \rightarrow FASC : FADD_2 : CASP8[]_c$	k_{3f}
r_{48}	$FASC : FADD_2 : CASP8[]_c \rightarrow FASC : FADD_2[CASP8]_c$	k_{3r}
r_{49}	$FASC : FADD_2[FLIP]_c \rightarrow FASC : FADD_2 : FLIP[]_c$	k_{3f}
r_{50}	$FASC : FADD_2 : FLIP[]_c \rightarrow FASC : FADD_2[FLIP]_c$	k_{3r}
r_{51}	$FASC : FADD_2 : CASP8[CASP8]_c \rightarrow FASC : FADD_2 : CASP8_2[]_c$	k_{3f}
r_{52}	$FASC : FADD_2 : CASP8_2[]_c \rightarrow FASC : FADD_2 : CASP8[CASP8]_c$	k_{3r}
r_{53}	$FASC : FADD_2 : CASP8[FLIP]_c \rightarrow FASC : FADD_2 : CASP8 : FLIP[]_c$	k_{3f}
r_{54}	$FASC : FADD_2 : CASP8 : FLIP[]_c \rightarrow FASC : FADD_2 : CASP8[FLIP]_c$	k_{3r}
r_{55}	$FASC : FADD_2 : FLIP[CASP8]_c \rightarrow FASC : FADD_2 : CASP8 : FLIP[]_c$	k_{3f}
r_{56}	$FASC : FADD_2 : CASP8 : FLIP[]_c \rightarrow FASC : FADD_2 : FLIP[CASP8]_c$	k_{3r}
r_{57}	$FASC : FADD_2 : FLIP[FLIP]_c \rightarrow FASC : FADD_2 : FLIP_2[]_c$	k_{3f}
r_{58}	$FASC : FADD_2 : FLIP_2[]_c \rightarrow FASC : FADD_2 : FLIP[FLIP]_c$	k_{3r}
r_{59}	$FASC : FADD[CASP8]_c \rightarrow FASC : FADD : CASP8[]_c$	k_{3f}
r_{60}	$FASC : FADD : CASP8[]_c \rightarrow FASC : FADD[CASP8]_c$	k_{3r}
r_{61}	$FASC : FADD[FLIP]_c \rightarrow FASC : FADD : FLIP[]_c$	k_{3f}
r_{62}	$FASC : FADD : FLIP[]_c \rightarrow FASC : FADD[FLIP]_c$	k_{3r}
r_{63}	$FASC : FADD_2 : CASP8_2[]_c \rightarrow FASC : FADD_2[CASP8_2^{P41}]_c$	k_4
r_{64}	$FASC : FADD_3 : CASP8_3[]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : CASP8[CASP8_2^{P41}]_c$	k_4
r_{65}	$FASC : FADD_3 : CASP8_2 : FLIP[]_c \rightarrow FASC : FADD_3 : FLIP[CASP8_2^{P41}]_c$	k_4
r_{66}	$FASC : FADD_3 : CASP8_2[]_c \rightarrow FASC : FADD_3[CASP8_2^{P41}]_c$	k_4
r_{67}	$[CASP8_2^{P41}]_c \rightarrow [CASP8_2^*]_c$	k_5
r_{68}	$[CASP8_2^*, CASP3]_c \rightarrow [CASP8_2^* : CASP3]_c$	k_{6f}
r_{69}	$[CASP8_2^* : CASP3]_c \rightarrow [CASP8_2^*, CASP3]_c$	k_{6r}
r_{70}	$[CASP8_2^*, CASP3^*]_c \rightarrow [CASP8_2^* : CASP3]_c$	k_7

label	rule	rate
r_{71}	$[CASP8_2^*, Bid]_c \rightarrow [CASP8_2^* : Bid]_c$	k_{8f}
r_{72}	$[CASP8_2^* : Bid]_c \rightarrow [CASP8_2^*, Bid]_c$	k_{8r}
r_{73}	$[CASP8_2^*, tBid]_c \rightarrow [CASP8_2^* : Bid]_c$	k_7
r_{74}	$[tBid, Bax]_c \rightarrow [tBid : Bax]_c$	k_{9f}
r_{75}	$[tBid : Bax]_c \rightarrow [tBid, Bax]_c$	k_{9r}
r_{76}	$[tBid : Bax, Bax]_c \rightarrow [tBid : Bax_2]_c$	k_{9f}
r_{77}	$[tBid : Bax_2]_c \rightarrow [tBid : Bax, Bax]_c$	k_{9r}
r_{78}	$tBid : Bax_2[Smac]_m \rightarrow Smac^*[]_m$	k_{10}
r_{79}	$tBid : Bax_2[Cyto.c]_m \rightarrow Cyto.c^*[]_m$	k_{10}
r_{80}	$[Smac^*, XIAP]_c \rightarrow [Smac^* : XIAP]_c$	k_{11f}
r_{81}	$[Smac^* : XIAP]_c \rightarrow [Smac^*, XIAP]_c$	k_{11r}
r_{82}	$[Cyto.c^*, Apaf]_c \rightarrow [Cyto.c^* : Apaf : ATP]_c$	k_{12f}
r_{83}	$[Cyto.c^* : Apaf : ATP]_c \rightarrow [Cyto.c^*, Apaf]_c$	k_{12r}
r_{84}	$[Cyto.c^* : Apaf : ATP, CASP9]_c \rightarrow [Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9]_c$	k_{13f}
r_{85}	$[Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9]_c \rightarrow [Cyto.c^* : Apaf : ATP, CASP9]_c$	k_{13r}
r_{86}	$[Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9, CASP9]_c \rightarrow [Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9_2]_c$	k_{14f}
r_{87}	$[Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9_2]_c \rightarrow [Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9, CASP9]_c$	k_{14r}
r_{88}	$[Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9_2]_c \rightarrow [Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9, CASP9^*]_c$	k_{15}
r_{89}	$[CASP9^*, CASP3]_c \rightarrow [CASP9^* : CASP3]_c$	k_{16f}
r_{90}	$[CASP9^* : CASP3]_c \rightarrow [CASP9^*, CASP3]_c$	k_{16r}
r_{91}	$[CASP9^* : CASP3]_c \rightarrow [CASP9^*, CASP3^*]_c$	k_{17}
r_{92}	$[CASP9, XIAP]_c \rightarrow [CASP9 : XIAP]_c$	k_{18f}
r_{93}	$[CASP9 : XIAP]_c \rightarrow [CASP9, XIAP]_c$	k_{18r}
r_{94}	$[CASP3^*, XIAP]_c \rightarrow [CASP3^* : XIAP]_c$	k_{19f}
r_{95}	$[CASP3^* : XIAP]_c \rightarrow [CASP3^*, XIAP]_c$	k_{19r}
r_{96}	$Bax[Bcl2]_m \rightarrow [Bcl2 : Bax]_m$	k_{20f}
r_{97}	$[Bcl2 : Bax]_m \rightarrow Bax[Bcl2]_m$	k_{20r}

Y las siguientes reglas para casos especiales:

label	rule	rate
$r_{96'}$	$Bid[Bcl2]_m \rightarrow [Bcl2 : Bid]_m$	k_{20f}
$r_{97'}$	$[Bcl2 : Bid]_m \rightarrow Bid[Bcl2]_m$	k_{20r}
$r_{96''}$	$tBid[Bcl2]_m \rightarrow [Bcl2 : tBid]_m$	k_{20f}
$r_{97''}$	$[Bcl2 : tBid]_m \rightarrow tBid[Bcl2]_m$	k_{20r}

Las constantes cinéticas (reaction rates) obtenidas de (*) son:

k_{1f}	$=$	$9.09E - 05 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_{1r}	$=$	$1.00E - 04 \text{ s}^{-1}$
k_{2f}	$=$	$5.00E - 04 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_{2r}	$=$	0.2 s^{-1}
k_{3f}	$=$	$3.50E - 03 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_{3r}	$=$	0.018 s^{-1}
k_4	$=$	0.3 s^{-1}	k_5	$=$	0.1 s^{-1}
k_{6f}	$=$	$1.00E - 05 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_{6r}	$=$	0.06 s^{-1}
k_7	$=$	0.1 s^{-1}	k_{8f}	$=$	$5.00E - 03 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
k_{8r}	$=$	0.005 s^{-1}	k_{9f}	$=$	$2.00E - 04 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
k_{9r}	$=$	0.02 s^{-1}	k_{10}	$=$	$1.00E - 03 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
k_{11f}	$=$	$7.00E - 03 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_{11r}	$=$	$2.21E - 03 \text{ s}^{-1}$
k_{12f}	$=$	$2.78E - 07 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_{12r}	$=$	$5.70E - 03 \text{ s}^{-1}$
k_{13f}	$=$	$2.84E - 04 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_{13r}	$=$	0.07493 s^{-1}
k_{14f}	$=$	$4.41E - 04 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_{14r}	$=$	0.1 s^{-1}
k_{15}	$=$	0.7 s^{-1}	k_{16f}	$=$	$1.96E - 05 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$
k_{16r}	$=$	0.05707 s^{-1}	k_{17}	$=$	4.8 s^{-1}
k_{18f}	$=$	$1.06E - 04 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_{18r}	$=$	$1.00E - 03 \text{ s}^{-1}$
k_{19f}	$=$	$2.47E - 03 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_{19r}	$=$	$2.40E - 03 \text{ s}^{-1}$
k_{20f}	$=$	$2.00E - 03 \text{ nM}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_{20r}	$=$	0.02 s^{-1}

(*) **F. Hua, M.G. Cornejo, M.H. Cardone, C.L. Stokes, D.A. Lauffenburger.** Effects of Bcl-2 Levels on FAS Signaling-Induced Caspase-3 Activation: Molecular Genetic Tests of Computational Model Predictions. **The Journal of Immunology**, **175**, 2 (2005), 985–995.

Primer experimento virtual en el modelo

- En un escenario “normal” (condiciones basales de receptores de Bcl2), vamos a analizar el tiempo de activación de la caspasa 3.

Modelo considerado a partir de la especificación del sistema P definido:

- * Multiconjuntos iniciales:

$$\mathcal{M}_e = \{FASL^{12500}\}$$

$$\mathcal{M}_s = \{FASR^{6023}\}$$

$$\mathcal{M}_c = \{FADD^{10040}, CASP8^{20074}, FLIP^{48786}, CASP3^{120460}, Bid^{15057}, Bax^{50189}, XIAP^{18069}, Apaf^{60230}, CASP9^{12046}\}$$

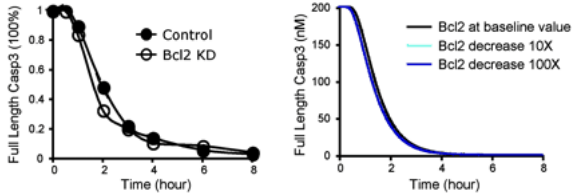
$$\mathcal{M}_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{45172}\}$$

- * Las constantes estocásticas deducidas de las constantes cinéticas antes descritas.

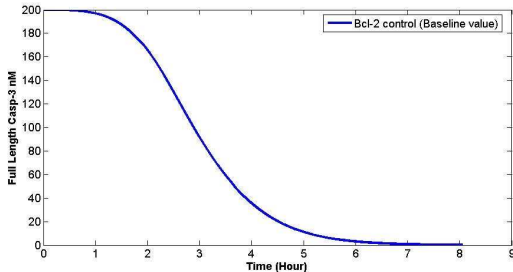
Valores obtenidos de: [Fei Hua](#) et al. Effects of Bcl-2 Levels on FAS Signaling-Induced Caspase-3 Activation: Molecular Genetic Tests of Computational Model Predictions. [The Journal of Immunology](#), **175**, 2 (2005), 985–995.

Resultados

- * Datos experimentales: activación de la caspasa 3 a las **6 horas**.
- * Modelo basado en ODEs: activación de la caspasa 3 a las **4 horas**.



- * Modelo basado en sistemas P: activación de la caspasa 3 a las **7 horas**.



Segundo experimento virtual en el modelo

- Se trata de analizar si el tipo de vía elegido depende de la concentración de la **caspasa 8** activada a partir del complejo proteínico FASR-FASL.

Scaffidi et al. sugieren⁷ que el tipo de vía elegido:

- Es la vía extrínseca (tipo I), si la concentración de la **caspasa 8** activada es **alta**.
- Es la vía intrínseca (tipo II), si la concentración de la **caspasa 8** activada es **baja**.

Chequeamos esta hipótesis en nuestro modelo:

- Incrementando 20 veces la concentración inicial de caspasa 8, respecto de su valor basal (el resto, igual).

$$\mathcal{M}_e = \{FASL^{12500}\}$$

$$\mathcal{M}_s = \{FASR^{6023}\}$$

$$\mathcal{M}'_c = \{FADD^{10040}, \text{CASP8}^{401480}, FLIP^{48786}, CASP3^{120460}, Bid^{15057}, \\ Bax^{50189}, XIAP^{18069}, Apaf^{60230}, CASP9^{12046}\}$$

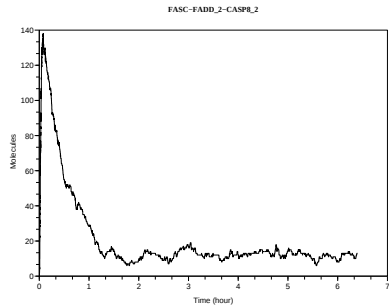
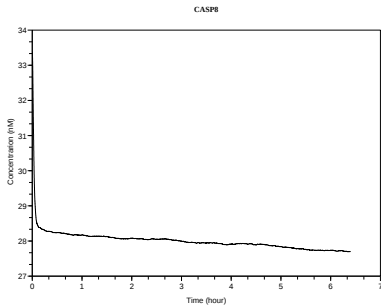
$$\mathcal{M}_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{45172}\}$$

Los resultados obtenidos muestran una activación más rápida de la caspasa 3 (tipo I).

Estos resultados coinciden con los datos experimentales y con los obtenidos en el modelo de F. Hua et al.

⁷ C. Scaffidi, S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M., Debatin, P.H. Krammer, M.E. Peter. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. **The EMBO Journal**, 17 (1998), 1675–1687.

Resultados



Tercer experimento virtual en el modelo

- Se trata de analizar la sensibilidad de la caspasa 3, respecto de la concentración de Bcl2, cuando la vía elegida es la mitocondrial.

Para ello, se incrementó 100 veces el número de moléculas de Bcl2 en el multiconjunto inicial $\mathcal{M}_m$

$$\mathcal{M}_e = \{FASL^{12500}\}$$

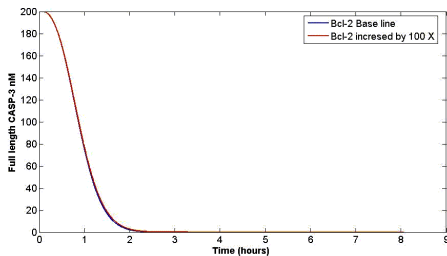
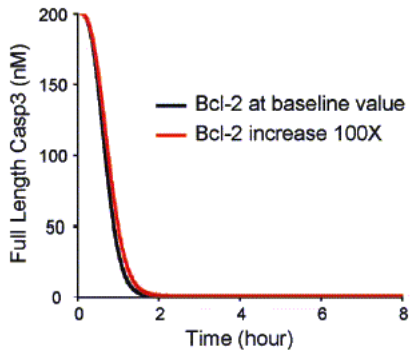
$$\mathcal{M}_s = \{FAS^{6023}\}$$

$$\mathcal{M}_c = \{FADD^{10040}, CASP8^{20074}, FLIP^{48786}, CASP3^{120460}, Bid^{15057}, \\ Bax^{50189}, XIAP^{18069}, Apaf^{60230}, CASP9^{12046}\}$$

$$\mathcal{M}'_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{4517200}\}$$

Los resultados muestran que la activación de la caspasa 3 no es sensible a la variación en la concentración de Bcl2, cuando el camino elegido es del tipo II. Estos resultados coinciden con los datos experimentales y con los obtenidos en el modelo de F. Hua et al.

Resultados

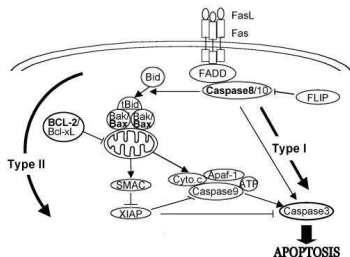


En ^{8,9,10} se presentan distintos mecanismos para bloquear la **vía mitocondrial**: enlazar Bcl2 con (a) Bax; (b) Bid; (c) tBid; o (d) a la vez con Bax y tBid.

Cuarto experimento virtual en el modelo

- Se trata de analizar qué mecanismo de bloqueo de la vía mitocondrial es más eficiente, hallando el tiempo de activación de la **caspa**sa 3.

El diseño del modelo de F. Hua et al. es muchísimo más complejo, a diferencia de lo que sucede con los sistemas P.



⁸ E.H. Cheng, M.C. Wei, S. Weiler, R.A. Flavell, T.W. Mak, T. Lindsten, S.J. Korsmeyer. BCL-2, BCL-XL sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. **Molecular Cell**, 8 (2001), 705–711.

⁹ Z.N. Oltavi, C.L. Milliman, S.J. Korsmeyer. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, 74, 4 (1993), 609–619.

¹⁰ A.Wells. A. EGFR–receptor. **Int. Journal Biochem. Cell Biology**, 31 (1999), 637–643.

Para ello, se consideran las siguientes nuevas reglas:

label	rule	rate
$r_{96'}$	$Bid[Bcl2]_m \rightarrow [Bcl2 : Bid]_m$	k_{20f}
$r_{97'}$	$[Bcl2 : Bid]_m \rightarrow Bid[Bcl2]_m$	k_{20r}
$r_{96''}$	$tBid[Bcl2]_m \rightarrow [Bcl2 : tBid]_m$	k_{20f}
$r_{97''}$	$[Bcl2 : tBid]_m \rightarrow tBid[Bcl2]_m$	k_{20r}

con las siguientes constantes cinéticas:

$$k_{20f} = 2.00E - 03 \text{ nM}^{-1}\text{s}^{-1} \quad k_{20r} = 0.02 \text{ s}^{-1}$$

Especificaciones de sistemas P

Las nuevas especificaciones de sistemas P multicompartimentales sólo afectan a las reglas. Son las siguientes:

(a) **Bcl2 enlaza con Bax:**

$$* \quad r_1, r_2, \dots, r_{95}, r_{96}, r_{97}$$

(b) **Bcl2 enlaza con Bid:**

$$* \quad r_1, r_2, \dots, r_{95}, r'_{96}, r'_{97}$$

(c) **Bcl2 enlaza con tBid:**

$$* \quad r_1, r_2, \dots, r_{95}, r''_{96}, r''_{97}$$

(d) **Bcl2 enlaza, a la vez, con Bax y tBid:**

$$* \quad r_1, r_2, \dots, r_{95}, r_{96}, r_{97}, r''_{96}, r''_{97}$$

MODULARIDAD de los sistemas P.

Modelos de sistemas P

Se consideran tres modelos para cada especificación:

- (1) la concentración de Bcl2 es la basal: $\mathcal{M}_e, \mathcal{M}_s, \mathcal{M}_c, \mathcal{M}_m$.
- (2) la concentración es 10 veces la basal: $\mathcal{M}_e, \mathcal{M}_s, \mathcal{M}_c, \mathcal{M}'_m$.
- (3) la concentración es 100 veces la basal: $\mathcal{M}_e, \mathcal{M}_s, \mathcal{M}_c, \mathcal{M}''_m$.

* siendo:

$$\mathcal{M}_e = \{FASL^{12500}\}$$

$$\mathcal{M}_s = \{FAS^{6023}\}$$

$$\mathcal{M}_c = \{FADD^{10040}, CASP8^{20074}, FLIP^{48786}, CASP3^{120460}, Bid^{15057}, \\ Bax^{50189}, XIAP^{18069}, Apaf^{60230}, CASP9^{12046}\}$$

$$\mathcal{M}_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{45172}\}$$

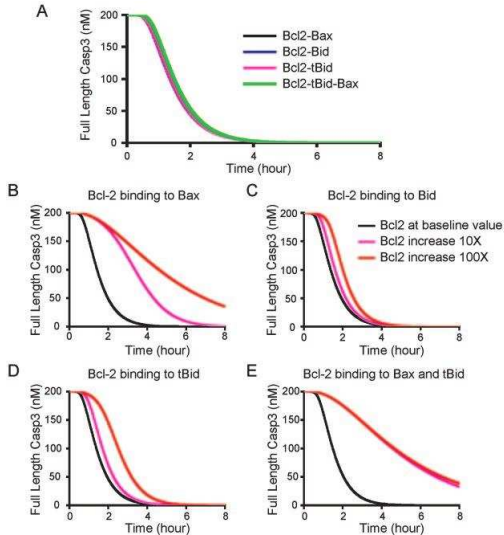
$$\mathcal{M}'_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{451720}\}$$

$$\mathcal{M}''_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{4517200}\}$$

- * Las constantes estocásticas deducidas de las constantes cinéticas antes descritas.

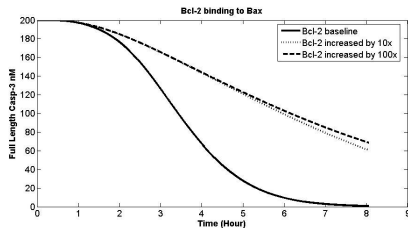
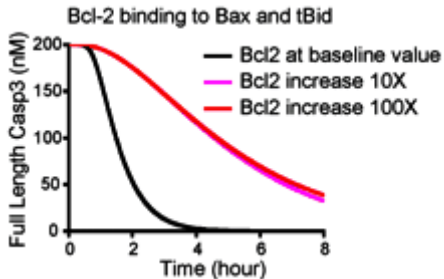
Resultados

Tiempo de activación de la caspasa 3:



Resultados

Comparativa de los resultados obtenidos en el modelo de F. Hua et al. y en nuestro modelo.



Simulación computacional para la experimentación virtual

- * Traducción del modelo a SBML (*System Biology Markup Language*)
- * Interfaz para la implementación de CLIPS usando JAVA.
- * Semántica basada en el algoritmo determinista de tiempo de espera.

(c) Comunicación inteligente de bacterias

Proceso del Quorum Sensing: mecanismo de control de expresión de genes, dependiente de la densidad celular ¹¹.

Permite a una colonia de bacterias dar una **respuesta** coordinada y simultánea.

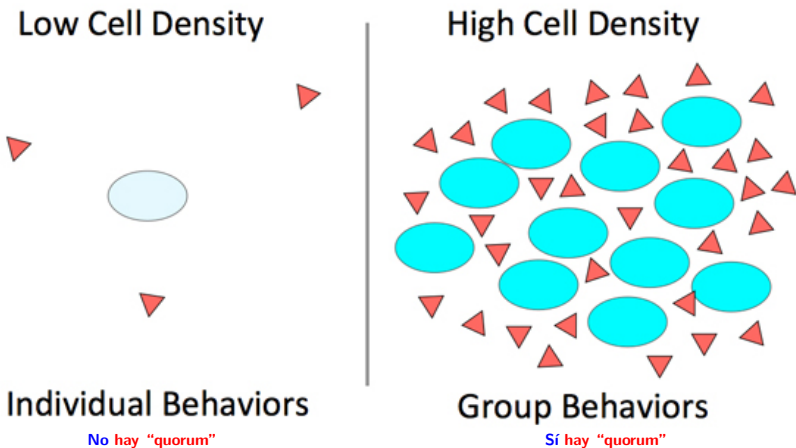
Algunas posibles acciones comunes:

- ★ Emisión de **luminiscencia** (*Vibrio Fischeri*) ¹²
- ★ Secreción de **sustancias viscosas** provocando infecciones (*Pseudomona aeruginosa*, Gram negativa)
- ★ Liberación de **toxinas** que matan a organismos (por anoxia) que le servirán de alimento (*Pfiesteria*)

¹¹ C.M. Waters, B.L. Bassler. Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 21 (2005), 319–346.

¹² K.H. Nealson, J.H. Hastings. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. **Microbiology Reviews**, 43, 4 (1979), 496–518.

Bacterial Quorum Sensing



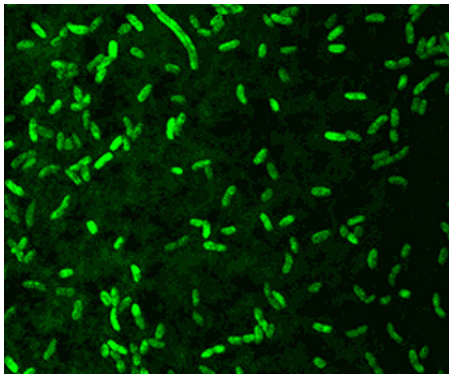
¿Cuál es el umbral del "quorum"? ¿Cómo "cuentan" las bacterias?

La bacteria *Vibrio Fischeri*

Bio-luminiscencia: capacidad de los organismos vivos para producir luz.

***Vibrio Fischeri*:** descubierta por K.H. Nealson y J.H. Hastings en 1979.

- * Bacteria bio-luminiscente.
- * Primera especie en la que se descubrió la señal clave en el quorum sensing (ACYL-homoserina lactosa: **OHHL**).



La bacteria *Vibrio Fischeri*

Puede vivir:

- * Librementemente en el plancton marino.
- * En estado de simbiosis en un calamar hawaiano o en ciertos peces.



Patógeno en ciertos invertebrados (poco frecuente).

La bacteria *Vibrio Fischeri*

Es capaz de producir **luz** en determinadas condiciones.

- ★ **NO** en el plancton.
- ★ **SÍ** en estado de simbiosis.

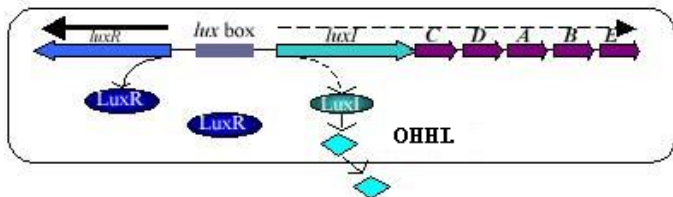
Efectos en el organismo anfitrión, de la producción de luz:

- * Atraen a las presas.
- * Permite acciones de camuflaje¹³ (respecto de sus depredadores):
 - Durante la noche, los órganos luminiscentes se dirigen al fondo marino, eliminando el rastro.

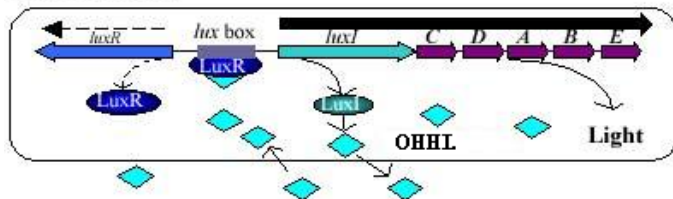
¹³ K.L Visick, J. Foster, J. Doino, M. McFall-Ngai, E.G. Ruby. *Vibrio fischeri* lux genes play an important role in colonization and development of the host light organ. *Journal of Bacteriology*, **182**, 16 (2000), 4578-4586.

La bacteria *Vibrio Fischeri*: Mecanismo

Low cell density



High cell density



La región **Lux Box** del genoma de la bacteria produce receptores **Lux R** y proteínas **Lux I** que, a su vez, originan **señales OHHL**.

Este proceso se inicia con una producción basal (estado de **baja regulación**).

Las señales se difunden de tal manera que pueden salir al entorno celular, o bien pueden penetrar en la propia bacteria (a través de la membrana plasmática).

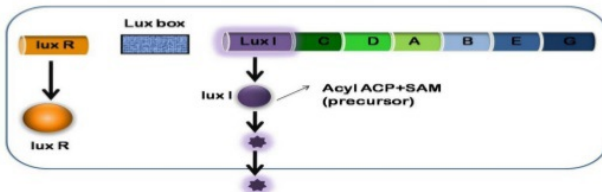
Cuando la concentración de señales en el interior supera un cierto umbral:

- El receptor **Lux R** se une a la señal **OHHL** formando un complejo **Lux R·OHHL**, que actúa como **factor de transcripción**.
- Ese complejo enlaza a la región **Lux Box** provocando su **excitación** (diremos que la **bacteria** se ha **excitado**):
 - ★ Incremento en la producción de señales y receptores.
 - ★ El inicio de la transcripción de un clúster de 5 genes.

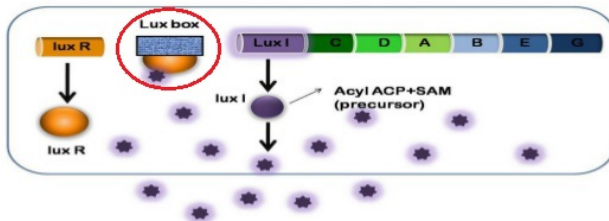
Las bacterias “**cuentan**” el número de individuos de la colonia, de una manera indirecta: a través de las señales **OHHL** que penetran en su interior (indicador del número de señales que pululan por el entorno de la colonia).

Quorum sensing in *Vibrio fischeri* at low and high cell density

Low cell density



High cell density



Modelo del QS en la bacteria *Vibrio fischeri*¹⁴

Sistema P multientorno de orden $(25, N, 1)$.

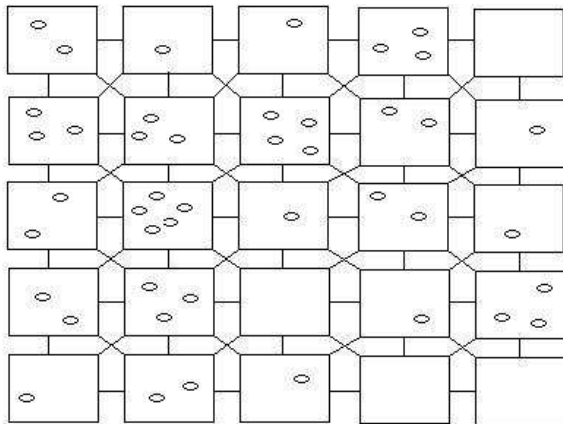
$$\mathbf{ME} = (G, \Gamma, \Sigma, T, N, \Pi_1, \{c_r \mid r \in \mathcal{R}_{\Pi_1}\}, \{E_i \mid 1 \leq i \leq 25\}, \mathcal{R}_E)$$

en donde:

- ★ G representa la estructura del sistema (25 entornos).
- ★ $\Gamma = \{\text{LuxR}, \text{LuxR.OHHL}, \text{LuxBox}, \text{LuxR.OHHL.LuxBox}, \text{OHHL}\}$
- ★ $\Sigma = \{\text{OHHL}\}$.
- ★ $E_i = \emptyset$, para $i = 1, \dots, 25$.
- ★ $\Pi_1 = (\Gamma, L, \mu, M_1, \mathcal{R}_{\Pi_1})$, en donde:
 - $L = \{b\}$.
 - $\mu = \begin{bmatrix} \end{bmatrix}$.
 - $M_1 = \{\text{LuxBox}\}$.

¹⁴ **F.J. Romero, M.J. Pérez-Jiménez.** A model of the Quorum Sensing System in *Vibrio Fischeri* using P systems. **Artificial Life**, 14, 1 (2008), 95–109.

Estructura del sistema P multicompartimental



Reglas de los sistemas Π_1 (**bacterias**): $\mathcal{R}_{\Pi_1}$

$$r_1 : [\text{LuxBox}]_b \xrightarrow{c_1} [\text{LuxBox} + \text{OHHL}]_b$$

$$r_2 : [\text{LuxBox}]_b \xrightarrow{c_2} [\text{LuxBox} + \text{LuxR}]_b$$

$$r_3 : [\text{LuxR} + \text{OHHL}]_b \xrightarrow{c_3} [\text{LuxR.OHHL}]_b$$

$$r_4 : [\text{LuxR.OHHL}]_b \xrightarrow{c_4} [\text{LuxR} + \text{OHHL}]_b$$

$$r_5 : [\text{LuxR.OHHL} + \text{LuxBox}]_b \xrightarrow{c_5} [\text{LuxR.OHHL.LuxBox}]_b$$

$$r_6 : [\text{LuxR.OHHL.LuxBox}]_b \xrightarrow{c_6} [\text{LuxR.OHHL} + \text{LuxBox}]_b$$

$$r_7 : [\text{LuxR.OHHL.LuxBox}]_b \xrightarrow{c_7} [\text{LuxR.OHHL.LuxBox} + \text{OHHL}]_b$$

$$r_8 : [\text{LuxR.OHHL.LuxBox}]_b \xrightarrow{c_8} [\text{LuxR.OHHL.LuxBox} + \text{LuxR}]_b$$

$$r_9 : [\text{OHHL}]_b \xrightarrow{c_9} \text{OHHL} []_b$$

$$r_{10} : [\text{OHHL}]_b \xrightarrow{c_{10}} []_b$$

$$r_{11} : [\text{LuxR}]_b \xrightarrow{c_{11}} []_b$$

$$r_{12} : [\text{LuxR.OHHL}]_b \xrightarrow{c_{12}} []_b$$

$$r_{13} : \text{OHHL} []_b \xrightarrow{c_{13}} [\text{OHHL}]_b$$

Reglas de los entornos: $\mathcal{R}_E$

$$r_{14} : [\text{OHHL}]_{e_i} \xrightarrow{c_{14}} [\]_{e_i}$$

$$r_{15} : [\text{OHHL}]_{e_i} - [\]_{e_j} \xrightarrow{c_{15}} [\]_{e_i} - [\text{OHHL}]_{e_j}$$

$$r_{16} : [[\]_b]_{e_i} - [\]_{e_j} \xrightarrow{c_{16}} [\]_{e_i} - [[\]_b]_{e_j}$$

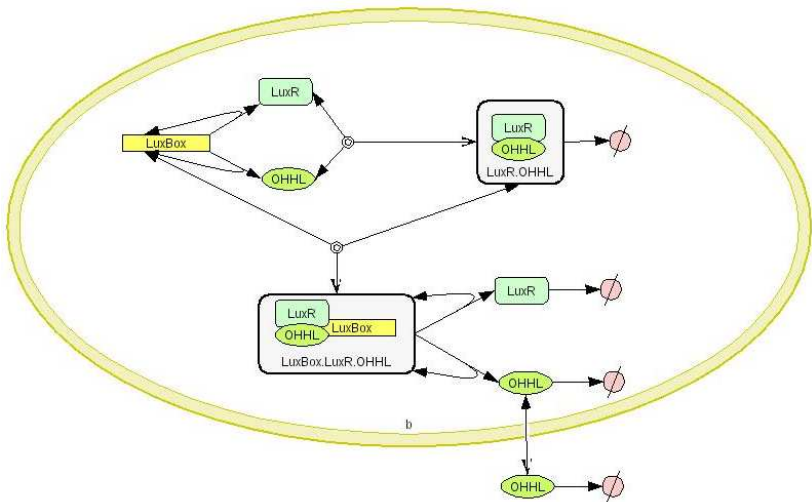
Constantes estocásticas asociadas a las reglas:

$$c_1 = 2, c_2 = 2, c_3 = 9, c_4 = 1, c_5 = 10, c_6 = 2, c_7 = 250, c_8 = 200 ,$$

$$c_9 = 50, c_{10} = 30, c_{11} = 20, c_{12} = 20, c_{13} = 1, c_{14} = 5, c_{15} = 8, c_{16} = 2.$$

Estos valores permiten que:

- (a) La tasa de degradación compense la producción basal de receptor y señal.
- (b) Las tasas de producción de receptor y señal se disparan cuando el LuxBox está excitado (ocupado por el complejo “receptor+señal”).



Representación gráfica de las reglas en las bacterias

Resultados y Discusiones

- ★ El modelo descrito ha sido representado en SBML, Systems Biology Markup Language ¹⁵.
- ★ El código SBML fue generado usando CellDesigner ¹⁶.
- ★ Semántica basada en el algoritmo multicompartimental de Gillespie.
- ★ Las simulaciones han sido ejecutadas usando un programa escrito en C con un fichero de entrada SBML especificando nuestro modelo.
- ★ Se ha estudiado la conducta emergente del sistema para poblaciones de diferente tamaño, a fin de analizar cómo las bacterias son **sensibles al quorum** (“perciben” la densidad celular).

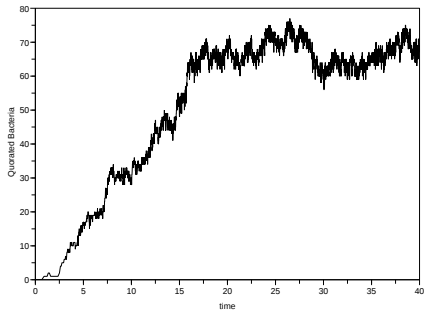
¹⁵SBML Web Site <http://sbml.org/index.psp>

¹⁶Cell Designer Web Site <http://www.celldesigner.org/>

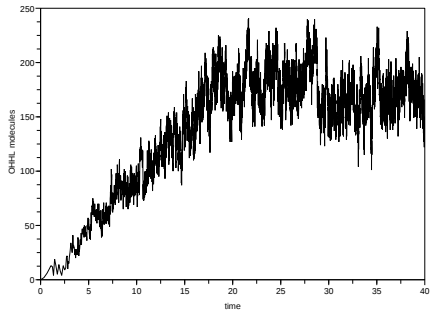
Primer experimento virtual en el modelo

- En una colonia de $N=100$ bacterias, vamos a analizar la correlación, a lo largo del tiempo, entre:
 - (a) El número de bacterias excitadas y el número de señales OHHL en el entorno.
 - (b) El número de señales en el interior de una bacteria y la excitación de la misma (ocupación del Lux Box por el complejo).

Analizamos el comportamiento de la colonia de **100** bacterias:

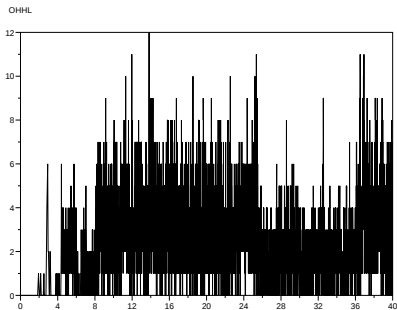


Número de **bacterias excitadas**

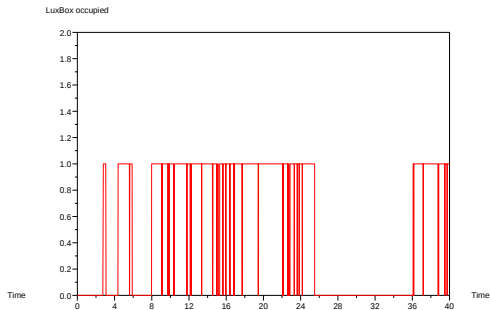


Número de **señales en el entorno**

Analizamos el comportamiento de **una** bacteria de la colonia:



Número de **señales** en el **interior** de **la** bacteria



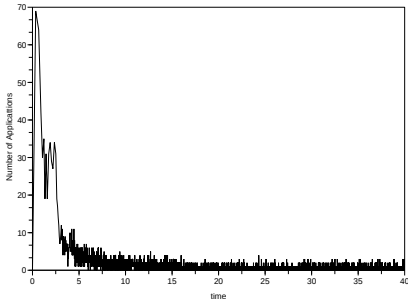
Excitación de **la** bacteria

Cuando el número de señales es superior a 7, la bacteria es excitada.

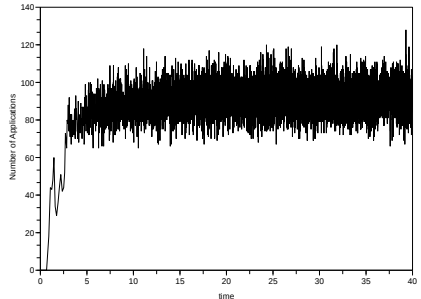
Segundo experimento virtual en el modelo

- En una colonia de $N=300$ bacterias, vamos a analizar la correlación, a lo largo del tiempo, entre:

- El número de ejecuciones de la regla r_1 (producción basal de señales) y el número de ejecuciones de la regla r_7 (producción masiva de señales).



Número de ejecuciones de r_1



Número de ejecuciones de r_7

$r_1 : [\text{LuxBox}]_b \xrightarrow{c_1} [\text{LuxBox} + \text{OHHL}]_b$

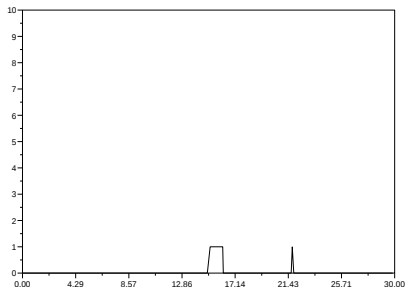
$r_7 : [\text{LuxR.OHHL.LuxBox}]_b \xrightarrow{c_7} [\text{LuxR.OHHL.LuxBox} + \text{OHHL}]_b$

Tercer experimento virtual en el modelo

- En una colonia de $N=10$ bacterias, vamos a analizar:

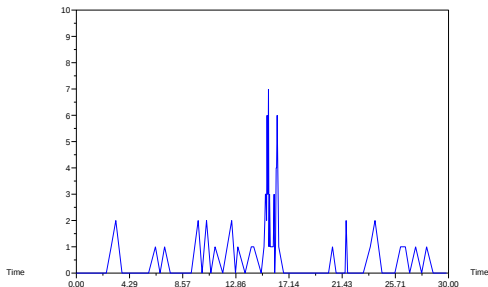
* El número de bacterias excitadas (que “cuentan” el número de individuos que hay en la colonia),

Quorated Bacteria



Número de bacterias excitadas

OHHL

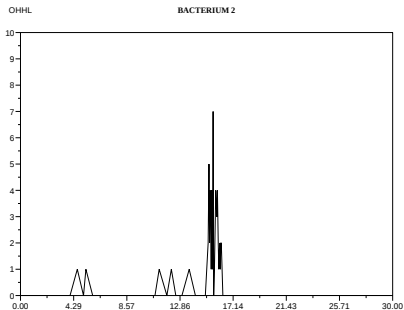


Número de señales en el entorno

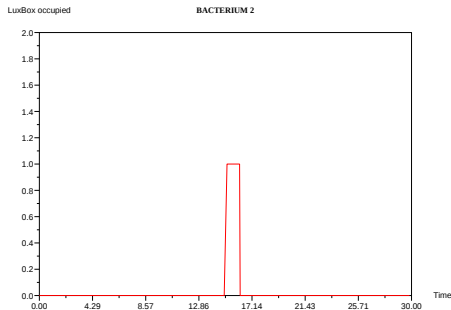
Sólo se excitó **una** bacteria, conjeturando mal el tamaño de la colonia (percibió que habían 7 señales).

Vamos a analizar a **esa** bacteria que se **equivocó**.

Veamos, a lo largo del tiempo, el comportamiento de **esa** bacteria que se excitó.



Número de señales en el interior de **la** bacteria



Estado de excitación o no de **la** bacteria

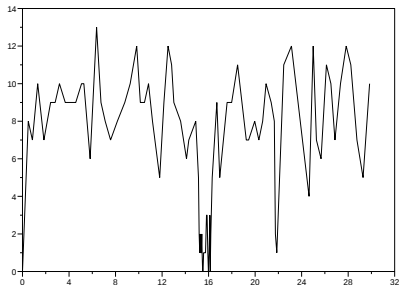
A los 15-16 seg. la bacteria percibió en su interior 7 señales y “decidió ” excitarse.

Posteriormente, la propia bacteria “observó” que ya no “le llegaban” 7 señales y, en consecuencia, revocó su decisión “errónea”, dejando de estar excitada.

Finalmente, se observa que la colonia de **10** bacterias permanece en un estado de **baja regulación**.

Number of Applications

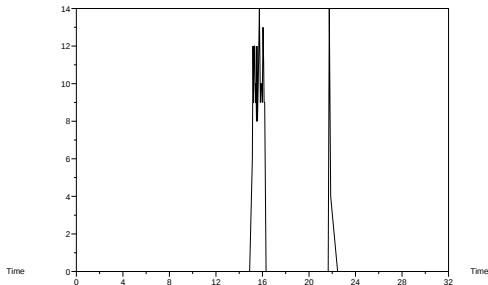
| LuxBox j*b* --> | LuxBox , OHHL j*b*



Número de ejecuciones de **r₁**

Number of Applications

| LuxBox-LuxR-OHHL j*b* --> | LuxBox-LuxR-OHHL , OHHL j*b*



Número de ejecuciones de **r₇**

- ★ Los resultados que se deducen de nuestro modelo¹⁷ están de acuerdo con los resultados que se han obtenido experimentalmente en el laboratorio ¹⁸.
- ★ Nuestra aproximación:
 - Usa sistemas P multicompartimentales con la semántica derivada del algoritmo multicompartimental de Gillespie.
 - Confirma la habilidad del marco de modelización computacional, basado en Membrane Computing, para detectar conductas emergentes en procesos moleculares y celulares (en los que la modelización basada en ODEs no funciona adecuadamente) .

¹⁷ **F.J. Romero, M.J. Pérez-Jiménez.** A model of the Quorum Sensing System in *Vibrio Fischeri* using P systems. **Artificial Life**, **14**, 1 (2008), 95–109.

¹⁸ **E.P. Greenberg, H.B. Kaplan, H.B.** Overproduction and purification of the luxR gene product: Transcriptional activator of the *vibrio fischeri* luminescence system. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, **84** (1997), 6639–6643.