

TÉCNICAS INTELIGENTES EN BIOINFORMÁTICA

Modelización de una ruta apoptótica de proteínas mediatizada por FAS

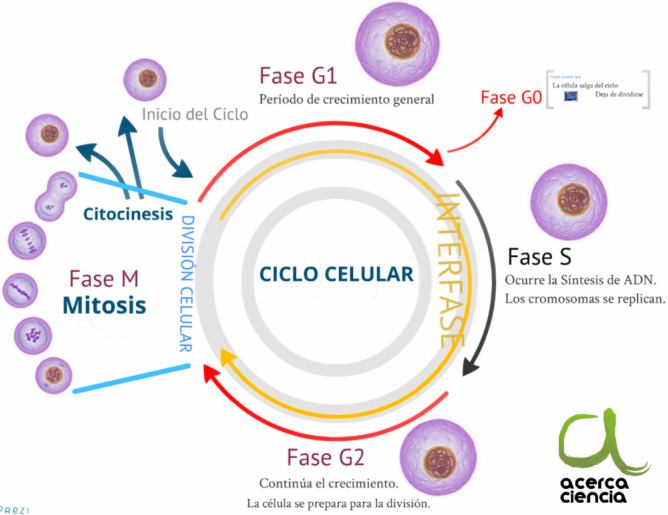
Mario de J. Pérez Jiménez
Grupo de investigación en Computación Natural
Dpto. Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial
Universidad de Sevilla

Máster Universitario en Lógica, Computación e Inteligencia Artificial

Curso 2014-15



Ciclo celular



▷ R21



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.

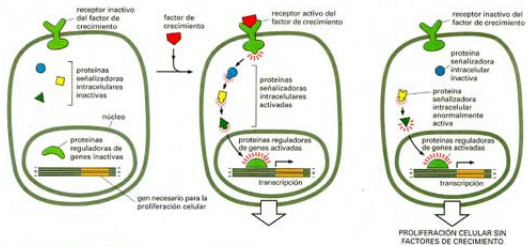
El número de células que componen un tejido en un organismo adulto debe permanecer constante (aprox.).

- ▶ Equilibrio (**homeostasis**) entre la proliferación celular y la muerte celular.

Cuando hay desequilibrio:

- ▶ Incremento en la proliferación: cáncer.
- ▶ 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.



(A) CÉLULA NORMAL EN REPOSO

(B) CÉLULA NORMAL EN PROLIFERACIÓN

(C) CÉLULA CANCEROSA EN PROLIFERACIÓN

Necrosis versus apoptosis

Existen dos mecanismos de muerte celular:

▶ **Necrosis**

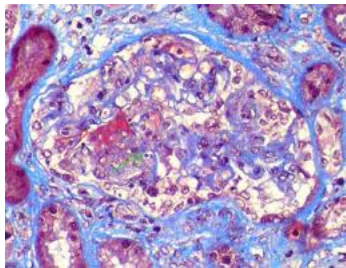
- Muerte por heridas, lesiones, senectud, etc.

▶ **Apoptosis**¹

- Muerte celular programada: evoca la caída de hojas en otoño o los pétalos de las flores.

¹J.F. Kerr et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal Cancer*, **26** (1972), 239

Necrosis



Cómo se produce la muerte celular por necrosis

- ▶ 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 del aspecto de la mitocondria.
- ▶ Se produce una marcada inflamación.

Este proceso puede conducir a la muerte a células vecinas.

Apoptosis

La apoptosis

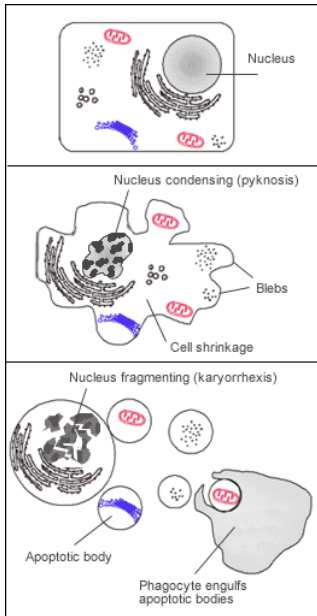
- ▶ Objetivo: eliminar células que ya no son necesarias.
- ▶ Mecanismo necesario para el correcto funcionamiento de un ser vivo.
- ▶ Aparece en las etapas del desarrollo donde se producen células en exceso.
- ▶ Puede ser una respuesta del organismo ante disfunciones graves.
- ▶ Juega un papel esencial en la **homeostasis celular**.
- ▶ Es conveniente que la muerte sea:
 - Rápida.
 - Efectiva.
 - 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

- ▶ 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:

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

▶ Una inducción positiva:

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

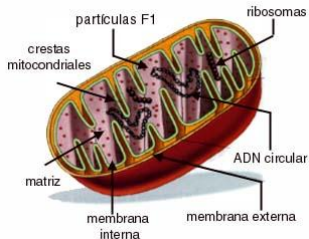
Las caspasas

Todos los cambios estructurales se producen por la transmisión de señales controladas por una familia de proteínas (caspasas).

- ▶ 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.
 - Cortan sustratos celulares necesarios para la supervivencia.

La mitocondria

Fábrica de producción de energía para la célula.



Es algo más: contiene muchas proteínas pro-apoptóticas.

- El **citocromo c** (transportador de electrones) : participa en la activación de la caspasa 9.

La función apoptótica se implementa cuando esas proteínas son “liberadas” de la mitocondria.

La familia Bcl2

Familia de proteínas Bcl2:

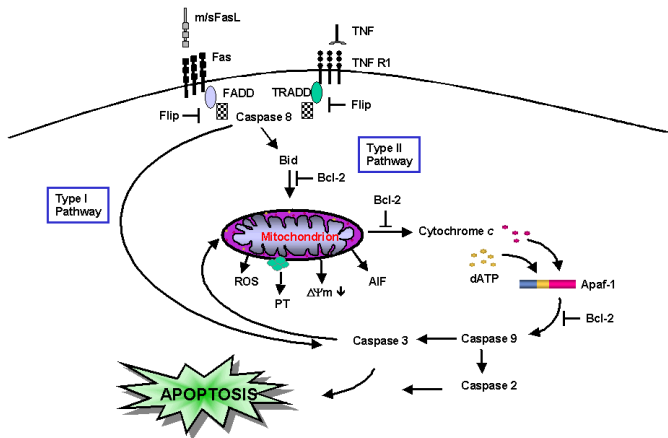
- Reguladores del proceso apoptótico.
- Específicamente controlan la salida del **citocromo c** de la mitocondria.

La familia de proteínas Bcl2 regulan la liberación de factores apoptóticos de la mitocondria hacia el **citósol** (medio acuoso del citoplasma en donde se encuentran los orgánulos celulares).

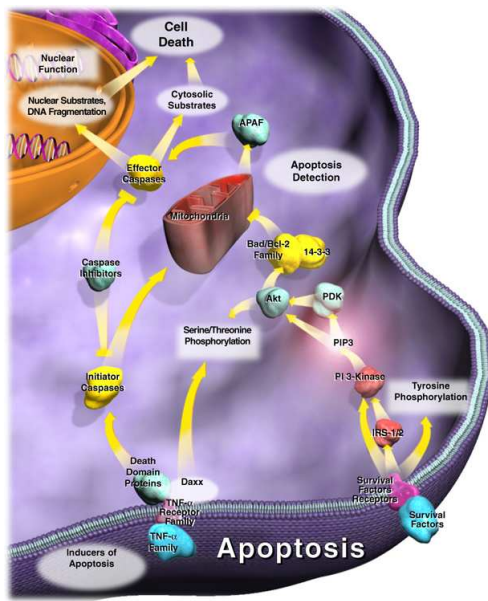
Los miembros de la familia Bcl2 se pasan el tiempo *controlándose* unos a otros.

- 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.

Apoptosis mediada por FAS



Apoptosis mediatizada por TNF



Vía extrínseca o de los receptores de muerte (I)

FASR (CD95) es un receptor de muerte:

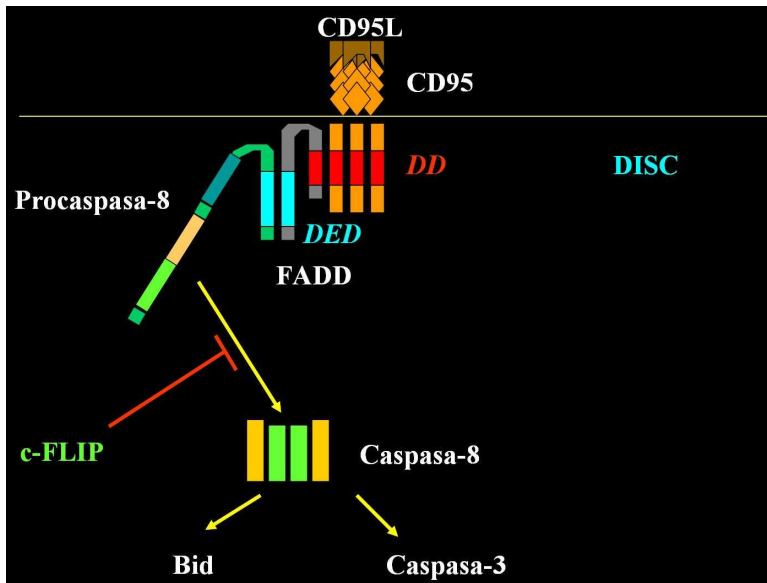
- Dominio **extracelular** que permite el enlace con FASL.
- Dominio **intracelular** que contiene un *dominio de muerte* (DD).

Comienza el proceso ...

- El ligando FASL enlaza con el receptor FASR en su dominio extracelular.
- Los receptores FAS activados reclutan moléculas adaptadoras (FADD) que contienen un *dominio efector de muerte* (DED) y enlaza con el DD de FASL.
- Se produce un complejo de señalización inductor de muerte (DISC) que recluta la pro-caspasa 8.
- La pro-caspasa 8 se escinde produciendo la activación de la caspasa 8 que es liberada del DISC al citosol.
- La caspasa 8 activa es liberada del DISC al citosol y rompe varias proteínas, incluida la pro-caspasa 3.
- La caspasa 3 activada provoca la muerte celular.

La inhibición de esta ruta es realizada por proteínas que contienen dos DED y que se unen al complejo FASL-FADD: proteínas FLIP.

Vía extrínseca o de los receptores de muerte (II)



Vía intrínseca o mitocondrial (I)

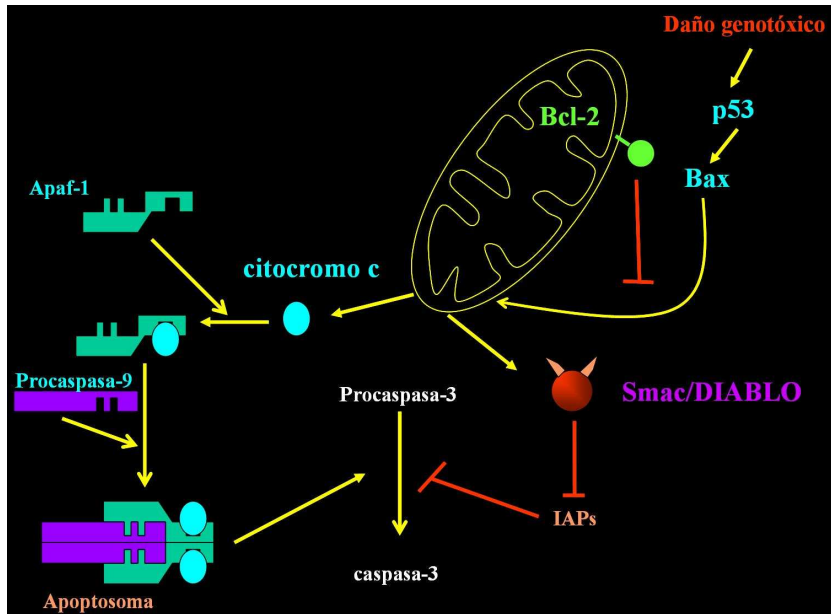
Se produce, básicamente, por daño en el citosol o en el núcleo (i.e. una célula que ha adquirido carácter neoplásico debido a daños en el ADN).

- El citocromo c es liberado de la mitocondria al citosol e induce la activación de caspasas.
- El citocromo c se une a la proteína Apaf-1 (otra molécula apoptótica efectora).
- El nuevo complejo permite la formación del apoptosoma reclutando a la pro-caspasa 9.
- La pro-caspasa 9 junto con el nucleótido ATP activa la caspasa 9.
- La caspasa 9 es capaz de cortar la pro-caspasa 3 y activar la caspasa 3 que es efectora.

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

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

Vía intrínseca o mitocondrial (II)



Modelos de la apoptosis mediatizada por FAS (I)

En (*) se da un modelo basado en ODEs para una **cascada de señales** relacionada con la apoptosis mediatizada por FAS.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con los resultados experimentales.

Se trata de presentar un modelo basado en sistemas P para la **misma** ruta señalizadora.

(*) F. Hua, M. Cornejo, M. Cardone, C. Stokes, D. 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.



Modelo de la apoptosis mediatizada por FAS (II) ²

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

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

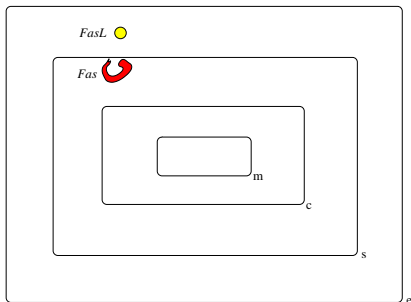
- **Alfabeto:** Representa todas las proteínas que intervienen en la cascada

Object	Protein or Complex
FAS	Fas protein
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

²S. Cheruku, A. Paun, 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.

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

Estructura de membranas: Cuatro regiones: el *entorno*, la *superficie celular*, el *citoplasma* y la *mitocondria*, etiquetados por *e*, *s*, *m* y *c*.



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

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

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

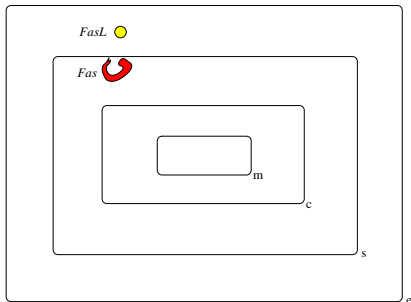
$$\mathcal{M}_c = \{FADD^{10040}, CASP8^{20074}, FLIP^{48786}, CASP3^{120460}, Bid^{15057}, Bax^{50189}, XIAP^{18069}, Apaf^{60230}, CASP9^{12046}\}$$

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

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

- ▶ Un ejemplo: $FASL [FAS]_s \rightarrow [FASC]_s$, c_{r_1}
- ▶ El objeto $FASL$ en el entorno y el objeto FAS 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:

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



label	rule	rate
r_1	$FASL[FAS]_s \rightarrow [FASC]_s$	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
r71 :	$[CASP8_2^*, Bid]_c \rightarrow [CASP8_2^* : Bid]_c$	k8f
r72 :	$[CASP8_2^* : Bid]_c \rightarrow [CASP8_2^*, Bid]_c$	k8r
r73 :	$[CASP8_2^*, tBid]_c \rightarrow [CASP8_2^* : Bid]_c$	k7
r74 :	$[tBid, Bax]_c \rightarrow [tBid : Bax]_c$	k9f
r75 :	$[tBid : Bax]_c \rightarrow [tBid, Bax]_c$	k9r
r76 :	$[tBid : Bax, Bax]_c \rightarrow [tBid : Bax_2]_c$	k9f
r77 :	$[tBid : Bax_2]_c \rightarrow [tBid : Bax, Bax]_c$	k9r
r78 :	$tBid : Bax_2 [Smac]_m \rightarrow Smac^* []_m$	k10
r79 :	$tBid : Bax_2 [Cyto.c]_m \rightarrow Cyto.c^* []_m$	k10
r80 :	$[Smac^*, XIAP]_c \rightarrow [Smac^* : XIAP]_c$	k11f
r81 :	$[Smac^* : XIAP]_c \rightarrow [Smac^*, XIAP]_c$	k11r
r82 :	$[Cyto.c^*, Apaf]_c \rightarrow [Cyto.c^* : Apaf : ATP]_c$	k12f
r83 :	$[Cyto.c^* : Apaf : ATP]_c \rightarrow [Cyto.c^*, Apaf]_c$	k12r
r84 :	$[Cyto.c^* : Apaf : ATP, CASP9]_c \rightarrow [Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9]_c$	k13f
r85 :	$[Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9]_c \rightarrow [Cyto.c^* : Apaf : ATP, CASP9]_c$	k13r
r86 :	$[Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9, CASP9]_c \rightarrow [Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9_2]_c$	k14f
r87 :	$[Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9_2]_c \rightarrow [Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9, CASP9]_c$	k14r
r88 :	$[Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9_2]_c \rightarrow [Cyto.c^* : Apaf : ATP : CASP9, CASP9^*]_c$	k15
r89 :	$[CASP9^*, CASP3]_c \rightarrow [CASP9^* : CASP3]_c$	k16f
r90 :	$[CASP9^* : CASP3]_c \rightarrow [CASP9^*, CASP3]_c$	k16r
r91 :	$[CASP9^* : CASP3]_c \rightarrow [CASP9^*, CASP3^*]_c$	k17
r92 :	$[CASP9, XIAP]_c \rightarrow [CASP9 : XIAP]_c$	k18f
r93 :	$[CASP9 : XIAP]_c \rightarrow [CASP9, XIAP]_c$	k18r
r94 :	$[CASP3^*, XIAP]_c \rightarrow [CASP3^* : XIAP]_c$	k19f
r95 :	$[CASP3^* : XIAP]_c \rightarrow [CASP3^*, XIAP]_c$	k19r
r96 :	$Bax [Bcl2]_m \rightarrow [Bcl2 : Bax]_m$	k20f
r97 :	$[Bcl2 : Bax]_m \rightarrow Bax [Bcl2]_m$	k20r

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:

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

(*) F. Hua, M. Cornejo, M. Cardone, C. Stokes, D. 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.



1. Tiempo de activación de la caspasa 3

El estudio se realiza con valores basales de Bcl2.

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

- ▶ Multiconjuntos iniciales:

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

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

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

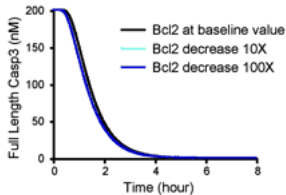
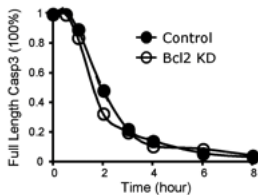
$$\mathcal{M}_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{45172}\}$$

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

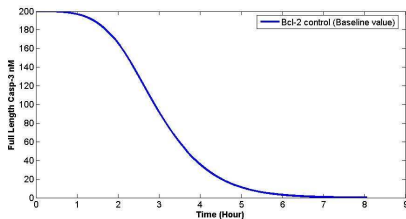
Valores obtenidos de: [F. Hua, M. Cornejo, M. Cardone, C. Stokes, D. Lauffenburger](#). Effects of Bcl-2 Levels on FAS Signaling-Induced Caspase-3 Activation: Molecular Genetic Tests of Computational Model Predictions. *The Journal of Immunology*, **175**, 2 (2005), 985–995.

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.



2. Dependencia de la elección de la vía apoptótica

Scaffidi et al. sugieren³ que el tipo de vía elegido depende de la concentración de la **caspara 8** activada a partir de FASL:

- Si es alta, elige la vía intrínseca (tipo I).
- Si es baja, elige la vía extrínseca (tipo II).

Chequeamos esta hipótesis en nuestro modelo:

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

$$\begin{aligned}\mathcal{M}_e &= \{FASL^{12500}\} \\ \mathcal{M}_s &= \{FAS^{6023}\} \\ \mathcal{M}'_c &= \{FADD^{10040}, CASP8^{401480}, FLIP^{48786}, CASP3^{120460}, Bid^{15057}, \\ &\quad Bax^{50189}, XIAP^{18069}, Apaf^{60230}, CASP9^{12046}\} \\ \mathcal{M}_m &= \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{45172}\}\end{aligned}$$

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

³Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The Embo Journal*, 17 (1998), 1675–1687.

3. Activación de la caspasa 3 respecto de la concentración de Bcl2

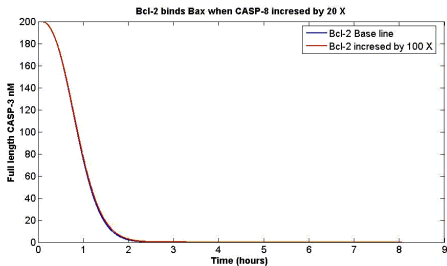
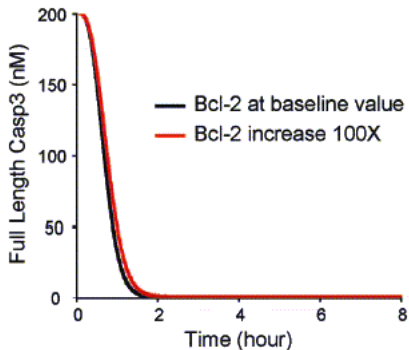
Se trata de estudiar la dependencia de la activación de la caspasa 3 respecto de la concentración de moléculas de Bcl2

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

$$\begin{aligned}\mathcal{M}_e &= \{FASL^{12500}\} \\ \mathcal{M}_s &= \{FAS^{6023}\} \\ \mathcal{M}_c &= \{FADD^{10040}, CASP8^{20074}, FLIP^{48786}, CASP3^{120460}, Bid^{15057}, \\ &\quad Bax^{50189}, XIAP^{18069}, Apaf^{60230}, CASP9^{12046}\} \\ \mathcal{M}'_m &= \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{4517200}\}\end{aligned}$$

Los resultados mostraron la **no sensibilidad** de la activación de la **caspasa 3** a la variación en la concentración de Bcl2 cuando el camino elegido es del tipo I (de acuerdo con los resultados experimentales y con los obtenidos por F. Hua et al.).

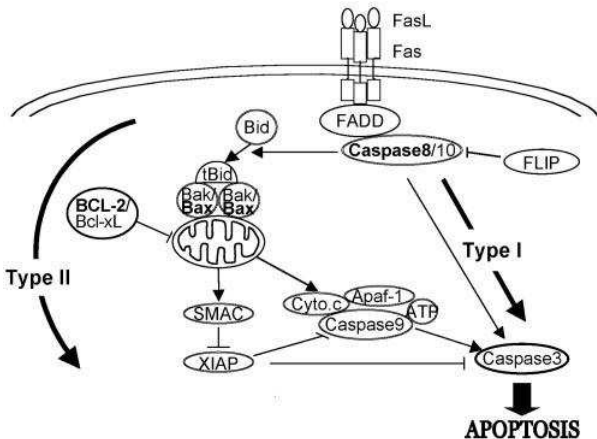
Resultados



4. Eficiencia del bloqueo de la vía extrínseca por Bcl2

En [1], [2] y [3] 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.

- Se estudia la activación de la caspasa 3 en la vía intrínseca, analizando qué mecanismo es más eficiente.



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:

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

-
- [1] 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.
- [2] Z.N. Oltavi, C.L. Milliman, S.J. Korsmeyer, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**, 4 (1993), 609–619.
- [3] K. Wang, X.M. Yin, D.T. Chao, C.L. Milliman, S.J. Korsmeyer. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes & Development*, **10** (1996), 2859–2869.

Especificaciones de sistemas P

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

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

- ▶ $r_1, r_2, \dots, r_{95}, r_{96}, r_{97}$

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

- ▶ $r_1, r_2, \dots, r_{95}, r'_{96}, r'_{97}$

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

- ▶ $r_1, r_2, \dots, r_{95}, r''_{96}, r''_{97}$

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

- ▶ $r_1, r_2, \dots, r_{95}, r_{96}, r_{97}, r''_{96}, r''_{97}$

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:

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

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

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

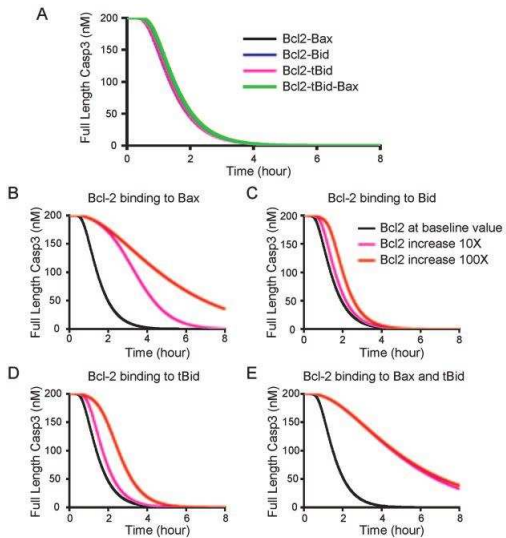
$$\mathcal{M}_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{45172}\}$$

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

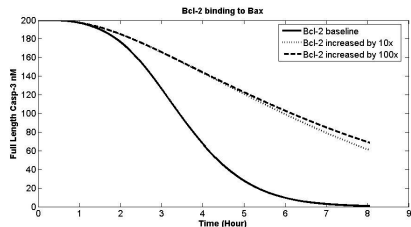
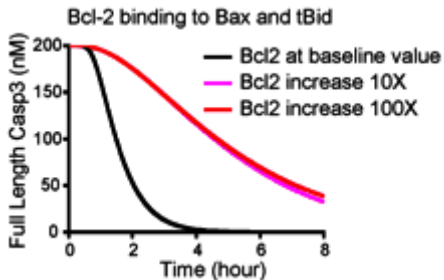
$$\mathcal{M}''_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{4517200}\}$$

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

Resultados



Resultados



El cuarto mecanismo es el más eficiente.

Conclusiones

Análisis de la sensibilidad de la activación de la **caspasa 3** a la sobreexpresión de la Bcl2 en función del camino seleccionado.

	Activación Caspasa 3 (con sobreexpresión de Bcl2)
Vía extrínseca (tipo I, receptor de muerte)	Insensible
Vía intrínseca (tipo II, mitocondria)	Sensible