

TEMA V

Modelización computacional de procesos celulares basada en sistemas P

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

Simulación y análisis computacional en Biología de Sistemas
Máster Universitario en Lógica, Computación e Inteligencia Artificial
Curso 2012-13



V 1. Una ruta del factor de crecimiento epidérmico

Factor de crecimiento epidérmico (EGFR): sistema receptor mejor conocido.

- ▶ Ha contribuido de manera decisiva los modelos formales.

Las células procesan la información antes de que ésta pase al núcleo.

En las cascadas de señales del *EGFR*, existen muchos puntos diferentes de control:

- ▶ Este tipo de rutas es especialmente interesante para la investigación.

Se estudiará un **modelo estocástico basado en sistemas P** de una **ruta señalizadora del EGFR**.

- ▶ Semántica basada en el algoritmo determinista de tiempo de espera.

EGFR: primera proteína descubierta con actividad quinasa-tirosina.

- ▶ Ha sido usada en estudios pioneros de procesos biológicos relacionados con la oncogénesis.

El *EGF* enlaza con el dominio extracelular de su receptor (*EGFR*) induciendo la dimerización del receptor y la fosforilización del dominio intracelular.

- ▶ Entonces una gran cantidad de proteínas son reclutadas iniciándose una compleja cascada de señales.

En nuestro modelo se consideran dos caminos marginales y dos principales.

- ▶ Todos ellos comienzan con la fosforilación del receptor *EGFR* (pasando a *EGFR**).

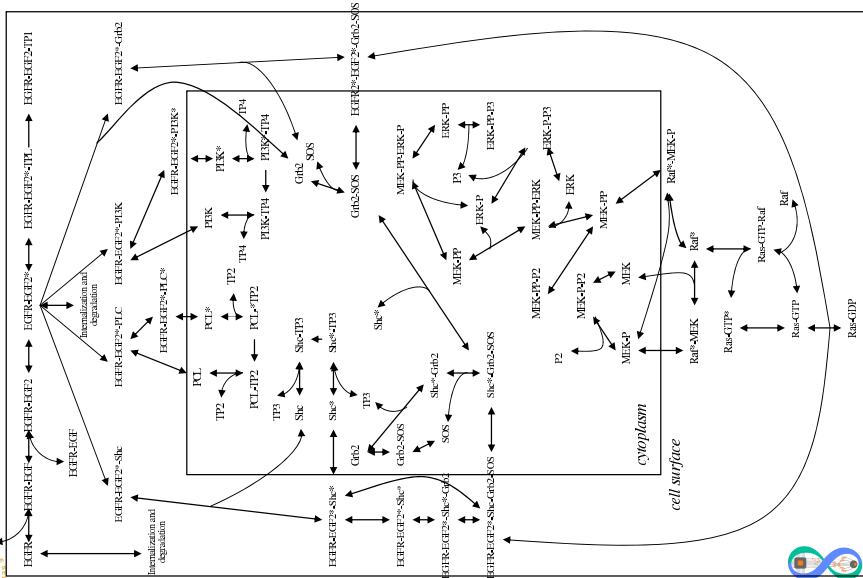
▶ Caminos marginales:

- ▶ **Primer camino marginal:** la fosfolipasa PLC_{γ} enlaza con $EGFR^*$ produciendo PLC_{γ}^* que va al citoplasma en donde puede ser desfosforilado o reconducido a la membrana celular.
- ▶ **Segundo camino marginal:** la proteína $PI3K$ enlaza con $EGFR^*$ produciendo $PI3K^*$ que va al citoplasma, en donde regula varias proteínas que no se incluyen en el modelo.

▶ Caminos principales:

- ▶ **Primer camino principal:** no depende de la concentración del Src ni de la proteína Shc . Se trata de un ciclo en donde $Grb2$ y SOS enlaza con el receptor fosforilado. Después el complejo $Grb2 - SOS$ pasa al citoplasma.
- ▶ **Segundo camino principal:** La proteína Shc enlaza con el receptor y es fosforilada. Entonces, o bien Shc^* pasa al citoplasma o las proteínas $Grb2$ y SOS enlaza con el receptor fosforilado formando el complejo $EGFR - EGF2^* - Shc^* - Grb2 - SOS$. Este complejo se disocia produciendo las proteínas Shc^* , $Grb2$ y SOS .

- ★ La proteína *Ras* – *GTP* es activada por estos dos caminos y estimula la ruta de la proteína *MAP* fosforilando las proteínas *Raf*, *MEK* y *ERK*.
- ★ La proteína *ERK* fosforilada regula varias proteínas celulares y varios factores nucleares de transcripción.
- ★ Existe unos *caminos cruzados*: Robustez del sistema.



Un modelo basado en sistemas P¹

Nuestro modelo consta de **60 proteínas y complejos proteínicos**, así como de **160 reacciones químicas**.

La especificación de nuestro sistema P es la siguiente:

$$\Pi_{EGF} = (O, \{e, s, c\}, \mu, (w_1, e), (w_2, s), (w_3, c), \mathcal{R}_e, \mathcal{R}_s, \mathcal{R}_c)$$

donde:

Alfabeto: Representamos las proteínas y complejos *relevantes*.

Object	Protein or Complex
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFR-EGF ₂	Dimerised Receptor
EGFR-EGF ₂ *-Shc	EGFR-EGF ₂ * and Shc complex
⋮	⋮
MEK	Mitogenic External Regulated Kinase
ERK	External Regulated Kinase

Estructura de membranas: Se consideran tres regiones, *entorno*, *superficie celular* y *citoplasma*, etiquetadas por *e*, *s* y *c*. La estructura es *lineal*.

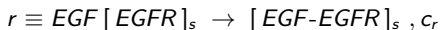
Multiconjuntos iniciales: Serán considerados en función del *modelo* que nos interese analizar.

Algunos datos podrían ser (Moehren et al., 2002):

$$\begin{aligned}w_1 &= \{EGF^{20000}\} \\w_2 &= \{EGFR^{25000}, Ras-GDP^{20000}\} \\w_3 &= \{Shc^{25000}, PLC^{15000}, PI3K^{5000}, SOS^{4000}, Grb2^{8000}, TP_1^{10000}, TP_2^{45000}, \\&\quad TP_3^{45000}, TP_4^{12500}, Raf^{8000}, MEK^{40000}, ERK^{40000}, P_1^{8000}, P_2^{8000}, P_3^{30000}\}\end{aligned}$$

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

- ▶ Ilustración de una regla de \mathcal{R}_e asociada al entorno:



Representa el enlace de una señal con su receptor.

- ▶ La señal EGF , situada en la membrana e , y el receptor $EGFR$, situado en la membrana s , producen el complejo $EGFR - EGF$ en s .
- ▶ La regla tiene asociada una constante cinética que permite calcular la **constante estocástica** c_r (afinidad receptor–señal).
- ▶ 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 superficie celular:



- ▶ La ejecución de esta regla permite que dos receptores $EGFR$ produzcan un objeto $EGFR_2$ que representa el complejo dimerizado.
- ▶ 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:

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

Table 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

Table 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

Table 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

Table 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

Table 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

Table 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

Table 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

Table 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

Table 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

Table 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	$\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2} [\text{SOS}]_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS} []_c$	0.01	Moehren et al 2002
38	$\text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2-SOS} []_c \rightarrow \text{EGFR-EGF2}^*-\text{Grb2} [\text{SOS}]_c$	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

Table 7: Shc cycle (I)

Reaction	Rule	Kinetic Constant	Reference
43	$EGFR-EGF2^* [Shc]_c \rightarrow EGFR-EGF2^*-Shc []_c$	0.1	Moehren et al 2002
44	$EGFR-EGF2^*-Shc []_c \rightarrow EGFR-EGF2^* [Shc]_c$	1	Moehren et al 2002
45	$[EGFR-EGF2^*-Shc]_s \rightarrow [EGFR-EGF2^*-Shc^*]_s$	20	Moehren et al 2002
46	$[EGFR-EGF2^*-Shc^*]_s \rightarrow [EGFR-EGF2^*-Shc]_s$	0.2	Moehren et al 2002
47	$EGFR-EGF2^*-Shc^* []_c \rightarrow EGFR-EGF2^*[Shc^*]_c$	5×10^{-4}	Moehren et al 2002
48	$EGFR-EGF2^*[Shc^*]_c \rightarrow EGFR-EGF2^*-Shc^* []_c$	3.56×10^{-7}	Moehren et al 2002
49	$[Shc^* TP_3]_c \rightarrow [Shc^*-TP_3]_c$	5×10^{-3}	Moehren et al 2002
50	$[Shc^*-TP_3]_c \rightarrow [Shc^* TP_3]_c$	9.5×10^{-2}	Moehren et al 2002
51	$[Shc^*-TP_3]_c \rightarrow [Shc-TP_3]_c$	0.15	Moehren et al 2002
52	$[Shc-TP_3]_c \rightarrow [Shc TP_3]_c$	2×10^{-4}	Moehren et al 2002
53	$[Shc TP_3]_c \rightarrow [Shc-TP_3]_c$	4×10^{-6}	Moehren et al 2002
54	$EGFR2^*-Shc^* [Grb2]_c \rightarrow EGFR2^*-Shc^*-Grb2 []_c$	1.5×10^{-3}	Moehren et al 2002
55	$EGFR2^*-Shc^*-Grb2 []_c \rightarrow EGFR2^*-Shc^* [Grb2]_c$	4.95×10^{-2}	Moehren et al 2002

Table 7: Shc cycle (II)

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

Table 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	$[EGFR-EGF2^*\ TP1]_c \rightarrow [EGFR-EGF2^*-TP1]_c$	0.03	Moehren et al 2002
77	$[EGFR-EGF2^*-TP1]_c \rightarrow [EGFR-EGF2^*\ TP1]_c$	5.91	Moehren et al 2002
78	$[EGFR-EGF2^*-TP1]_c \rightarrow [EGFR-EGF2-TP1]_c$	7.44	Moehren et al 2002
79	$[EGFR-EGF2-TP1]_c \rightarrow [EGFR-EGF2\ TP1]_c$	5.1×10^{-3}	Moehren et al 2002
80	$[EGFR-EGF2\ TP1]_c \rightarrow [EGFR-EGF2-TP1]_c$	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

Table 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

Table 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

Table 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

Table 10: Ras and Raf activation (I)

Reaction	Rules	Kinetic Cons
114	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS Ras-GDP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s$	0.015
115	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS Ras-GDP}]_s$	1.3
116	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS Ras-GTP}]_s$	0.5
117	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS Ras-GTP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GDP}]_s$	1×10^{-4}
118	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS Ras-GTP}^*]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s$	2.1×10^{-4}
119	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS Ras-GTP}^*]_s$	0.4
120	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS Ras-GDP}]_s$	0.023
121	$[\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS Ras-GDP}]_s \rightarrow [\text{EGFR-EGF2}^* \text{-Grb2-SOS-Ras-GTP}]_s$	2.2×10^{-4}
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
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
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
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}
126	$[\text{Ras-GTP Raf}]_s \rightarrow [\text{Ras-GTP-Raf}]_s$	0.001
127	$[\text{Ras-GTP-Raf}]_s \rightarrow [\text{Ras-GTP Raf}]_s$	0.0053

Table 10: Ras and Raf activation (II)

Reaction	Rules	Kinetic Con
128	$[Ras-GTP-Raf]_s \rightarrow [Ras-GTP^* Raf^*]_s$	1
129	$[Ras-GTP^* Raf^*]_s \rightarrow [Ras-GTP-Raf]_s$	7×10^{-7}
130	$[EGFR-EGF2^*-Shc^*-Grb2-SOS Ras-GTP^*]_s \rightarrow [EGFR-EGF2^*-Shc^*-Grb2-SOS-Ras-GTP]_s$	7.9×10^{-7}
131	$[EGFR-EGF2^*-Shc^*-Grb2-SOS-Ras-GTP]_s \rightarrow [EGFR-EGF2^*-Shc^*-Grb2-SOS Ras-GTP^*]_s$	0.3
132	$[EGFR-EGF2^*-Shc^*-Grb2-SOS-Ras-GTP]_s \rightarrow [EGFR-EGF2^*-Shc^*-Grb2-SOS Ras-GDP]_s$	0.023
133	$[EGFR-EGF2^*-Shc^*-Grb2-SOS Ras-GDP]_s \rightarrow [EGFR-EGF2^*-Shc^*-Grb2-SOS-Ras-GTP]_s$	2.2×10^{-7}

Table 11: MEK and ERK activation (I)

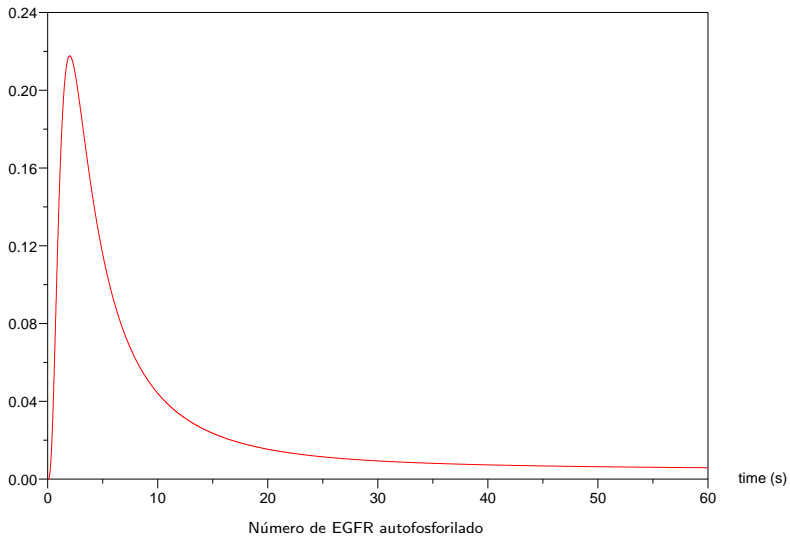
Reaction	Rules	Kinetic Constant	Reference
134	$\text{Raf}^* [\text{Phosp}_1]_c \rightarrow \text{Raf}^* \text{-Phosp}_1 []_c$	0.0717	Huang et al 1996
135	$\text{Raf}^* \text{-Phosp}_1 []_c \rightarrow \text{Raf}^* [\text{Phosp}_1]_c$	0.2	Huang et al 1996
136	$\text{Raf}^* \text{-Phosp}_1 []_c \rightarrow \text{Raf} [\text{Phosp}_1]_c$	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

Table 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

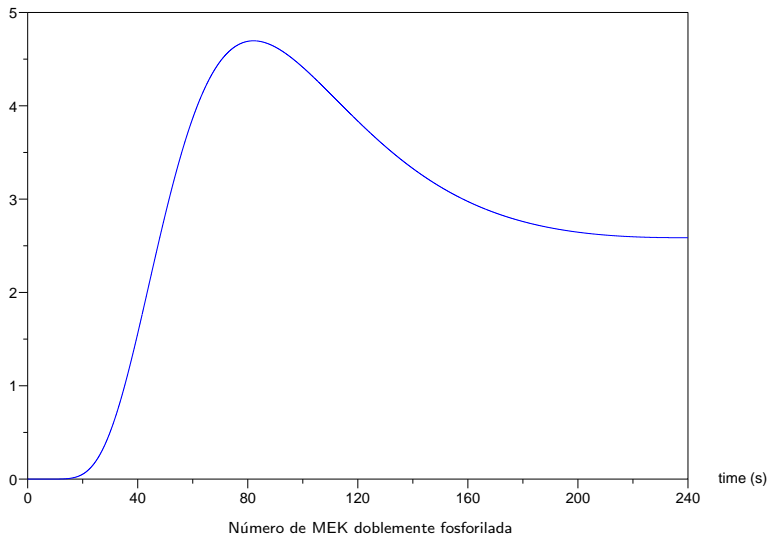
Molecules (nM)

Receptor Autophosphorylation

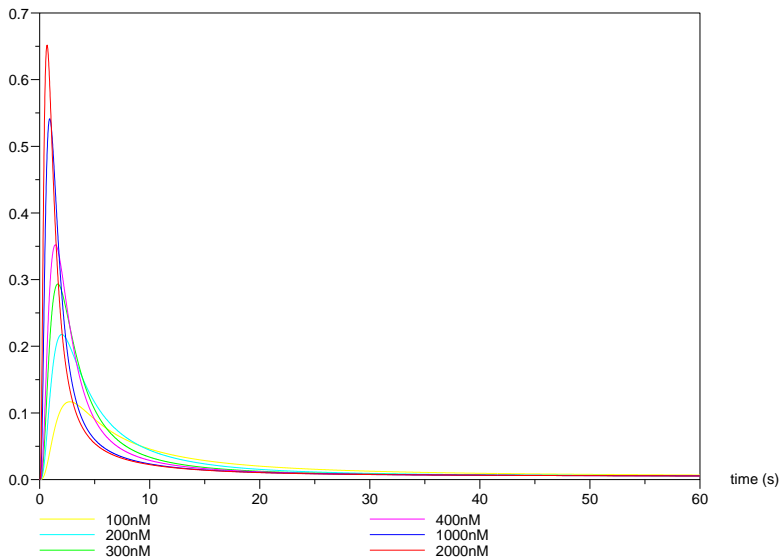


Molecules (nM)

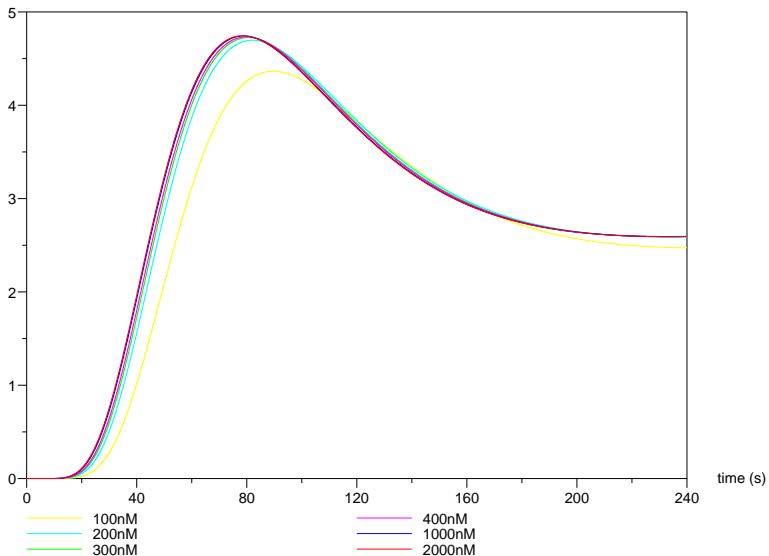
MEK phosphorylation



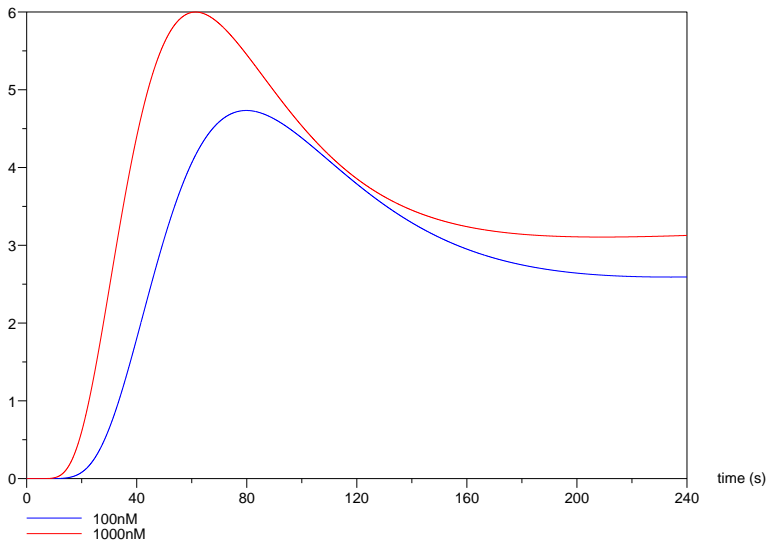
Molecules (nM)



Molecules (nM)



Molecules (nM)



Simulación computacional

- ▶ 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.

V 2. Una ruta apoptótica mediatizada por FAS

Necrosis versus apoptosis

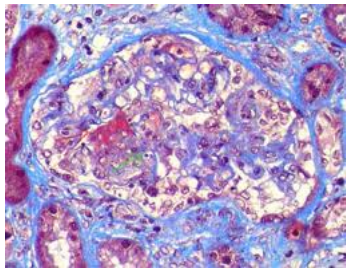
Existen dos mecanismos de muerte celular:

- ▶ *Necrosis* (muerte por heridas, lesiones, senectud, ...).
- ▶ *Apoptosis*² (muerte celular programada).

Cómo se produce la muerte celular por necrosis:

- ▶ Es un proceso (en general) independiente de las caspasas.
- ▶ Ausencia de condensación del contenido celular.
- ▶ Aparecen disfunciones en los orgánulos celulares.
- ▶ Rotura de la membrana plasmática.
- ▶ Alteración del aspecto de la mitocondria.
- ▶ Se produce una marcada inflamación.

Necrosis



Apoptosis

La apoptosis

- ▶ Aparece durante el desarrollo.
- ▶ Es una respuesta del organismo ante disfunciones graves.
- ▶ Juega un papel esencial en la *homeostasis celular* (regulación del equilibrio del número de células en los tejidos).
- ▶ Es conveniente que la muerte sea:
 - ▶ Rápida.
 - ▶ Efectiva.
 - ▶ Limpia (la célula muerta es **absorbida**).

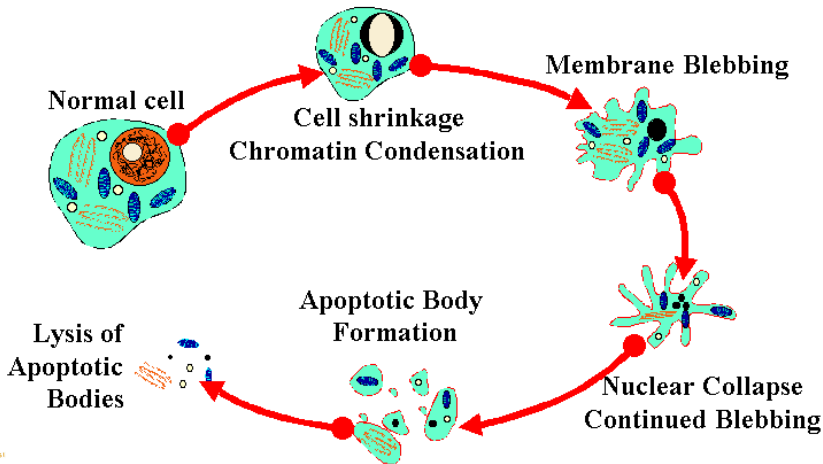
Con el conocimiento de la apoptosis:

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

Cómo se produce la muerte celular por apoptosis

- ▶ Condensación del contenido celular (cromatina).
- ▶ Fragmentación del ADN (por la acción de una endonucleasa que se activan por ciertas caspasas CAD).
- ▶ Alteración de aspectos funcionales de la mitocondria.
- ▶ Condensación del citoplasma.
- ▶ Pérdida de contacto/adhesión con las células vecinas. (por la 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 rápidamente por células vecinas.
- ▶ No se produce la rotura de la membrana plasmática.
- ▶ No se produce inflamación

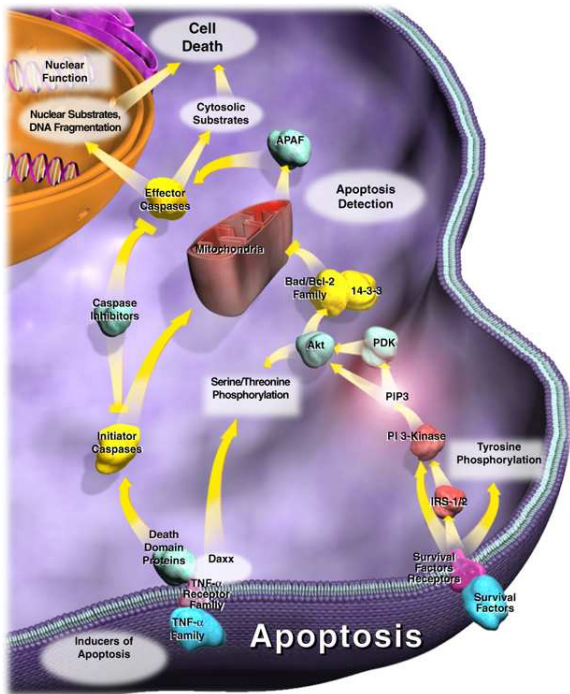
Apoptosis (Programmed Cell Death)



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



Vía extrínseca o de los receptores de muerte (I)

FASR (CD95) es un receptor de muerte:

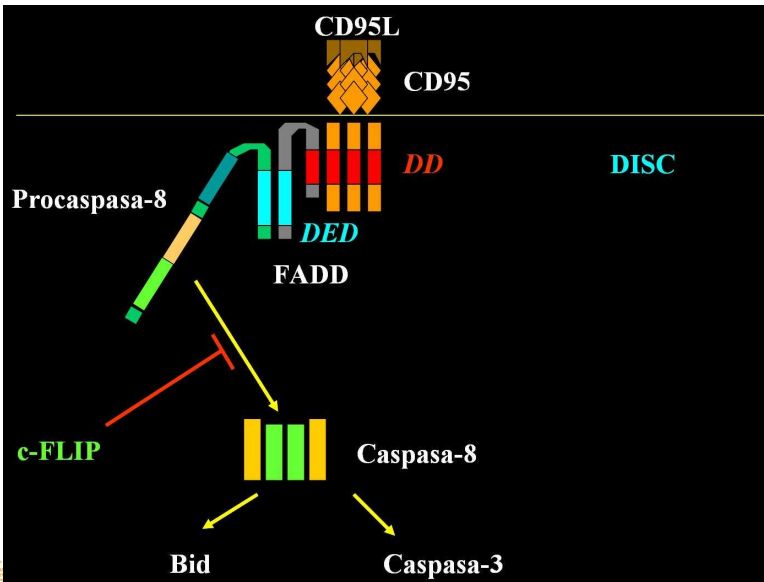
- ▶ Dominio extracelular que permite el enlace con FASL.
- ▶ Dominio intracelular que se denomina *dominio de muerte*.

La vía extrínseca se produce, básicamente, cuando los receptores de muerte son *reconocidos* por sus ligandos específicos.

- ▶ Se activa por la unión de FASL al dominio extracelular.
- ▶ Se produce un complejo de señalización inductor de muerte (DISC).
- ▶ El adaptador FADD se une al dominio de muerte de FASR.
- ▶ Y se recluta en el DISC la pro-caspasa 8.
- ▶ La caspasa 8 activa es liberada del DISC al citoplasma y rompe varias proteínas, incluida la pro-caspasa 3.
- ▶ La caspasa 3 activada provoca la muerte celular.

Esta vía puede ser inhibida por la acción de unas proteínas FLIP.

Vía extrínseca o de los receptores de muerte (II)



La familia Bcl2

Familia de proteínas Bcl2: otros reguladores del proceso apoptótico.

La mitocondria es algo más que la productora de energía de la célula.

Es capaz de *secuestrar* al **Citocromo c** (simple transportador de electrones) que juega un papel esencial en la apoptosis que sigue la ruta mitocondrial.

La familia de proteínas Bcl2 regulan la liberación de factores apoptóticos de la mitocondria (hacia el citosol, 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.

Vía intrínseca o mitocondrial (I)

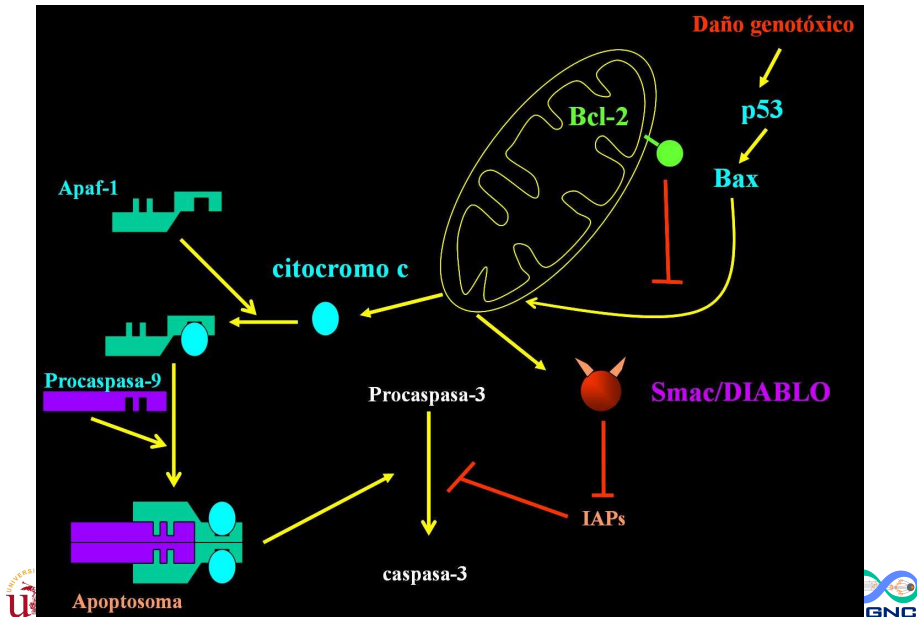
Se produce, básicamente, por daño en el citosol o en el núcleo (i.e. una célula que ha adquirido carácter neoplásico debido a daños en el ADN).

- ▶ 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.

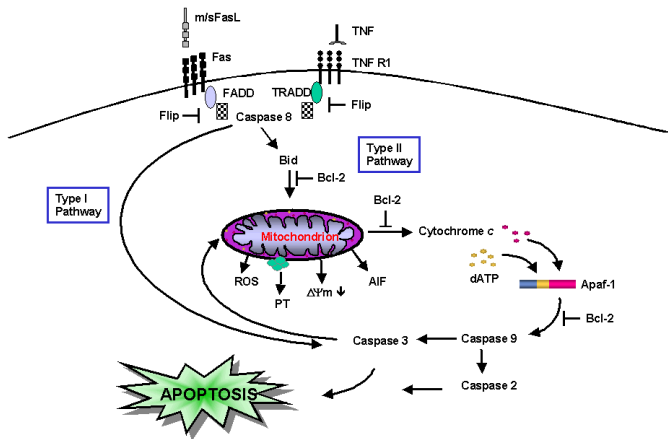
El Smac-DIABLO liberado al citosol es capaz de inducir apoptosis (mediante un mecanismo que se desconoce).

Vía intrínseca o mitocondrial (II)



Modelos de la apoptosis mediada por FAS (I)

- ▶ La proteína FAS se activa y recluta moléculas
- ▶ Estas moléculas activan la **caspa 8**
- ▶ Mediante un proceso complejo, la **caspa 8** activará la **caspa 3** que provoca la muerte celular.



Modelos de la apoptosis mediatizada por FAS (II)

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 celular de la apoptosis mediatizada por FAS (III) ³

Sistema P usando como semántica un *algoritmo determinista de tiempo de espera*

Nuestro modelo consta de 53 proteínas y 99 reacciones químicas

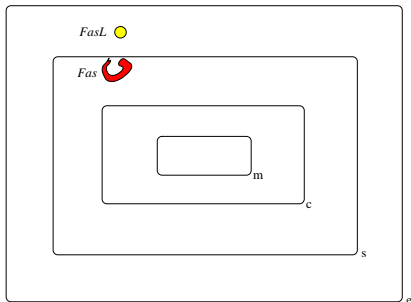
$$\Pi_{FAS} = (\Sigma, \{e, s, c, m\}, \mu, (\mathcal{M}_e, \mathcal{M}_s, \mathcal{M}_c, \mathcal{M}_m), (\mathcal{R}_e, \mathcal{R}_s, \mathcal{R}_c, \mathcal{R}_m))$$

- ▶ **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

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

- ▶ **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)

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

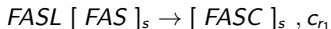
$$\mathcal{M}_s = \{FAS^{6023}\}$$

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

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

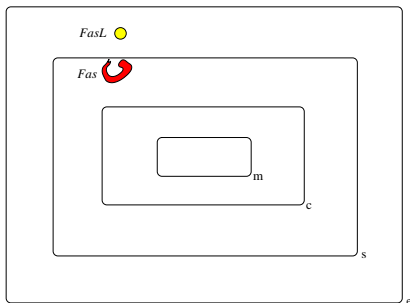
- ▶ **Reglas:** Se modelizan 99 reacciones químicas que constituyen la cascada.

- ▶ Un ejemplo:



- ▶ 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 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 → FASC : FADD ₃ : CASP8 ₂ [CASP8] _c	k _{3r}
r ₃₇	FASC : FADD ₃ : CASP8 ₂ [FLIP] _c → FASC : FADD ₃ : CASP8 ₂ : FLIP[] _c	k _{3f}
r ₃₈	FASC : FADD ₃ : CASP8 ₂ : FLIP[] _c → FASC : FADD ₃ : CASP8 ₂ [FLIP] _c	k _{3r}
r ₃₉	FASC : FADD ₃ : CASP8 : FLIP[CASP8] _c → FASC : FADD ₃ : CASP8 ₂ : FLIP[] _c	k _{3f}
r ₄₀	FASC : FADD ₃ : CASP8 ₂ : FLIP[] _c → FASC : FADD ₃ : CASP8 : FLIP[CASP8] _c	k _{3r}
r ₄₁	FASC : FADD ₃ : CASP8 : FLIP[FLIP] _c → FASC : FADD ₃ : CASP8 : FLIP ₂ [] _c	k _{3f}
r ₄₂	FASC : FADD ₃ : CASP8 : FLIP ₂ [] _c → FASC : FADD ₃ : CASP8 : FLIP[FLIP] _c	k _{3r}
r ₄₃	FASC : FADD ₃ : FLIP ₂ [CASP8] _c → FASC : FADD ₃ : CASP8 : FLIP ₂ [] _c	k _{3f}
r ₄₄	FASC : FADD ₃ : CASP8 : FLIP ₂ [] _c → FASC : FADD ₃ : FLIP ₂ [CASP8] _c	k _{3r}
r ₄₅	FASC : FADD ₃ : FLIP ₂ [FLIP] _c → FASC : FADD ₃ : FLIP ₃ [] _c	k _{3f}
r ₄₆	FASC : FADD ₃ : FLIP ₃ [] _c → FASC : FADD ₃ : FLIP ₂ [FLIP] _c	k _{3r}
r ₄₇	FASC : FADD ₂ [CASP8] _c → FASC : FADD ₂ : CASP8[] _c	k _{3f}
r ₄₈	FASC : FADD ₂ : CASP8[] _c → FASC : FADD ₂ [CASP8] _c	k _{3r}
r ₄₉	FASC : FADD ₂ [FLIP] _c → FASC : FADD ₂ : FLIP[] _c	k _{3f}
r ₅₀	FASC : FADD ₂ : FLIP[] _c → FASC : FADD ₂ [FLIP] _c	k _{3r}
r ₅₁	FASC : FADD ₂ : CASP8[CASP8] _c → FASC : FADD ₂ : CASP8 ₂ [] _c	k _{3f}
r ₅₂	FASC : FADD ₂ : CASP8 ₂ [] _c → FASC : FADD ₂ : CASP8[CASP8] _c	k _{3r}
r ₅₃	FASC : FADD ₂ : CASP8[FLIP] _c → FASC : FADD ₂ : CASP8 : FLIP[] _c	k _{3f}
r ₅₄	FASC : FADD ₂ : CASP8 : FLIP[] _c → FASC : FADD ₂ : CASP8[FLIP] _c	k _{3r}
r ₅₅	FASC : FADD ₂ : FLIP[CASP8] _c → FASC : FADD ₂ : CASP8 : FLIP[] _c	k _{3f}
r ₅₆	FASC : FADD ₂ : CASP8 : FLIP[] _c → FASC : FADD ₂ : FLIP[CASP8] _c	k _{3r}
r ₅₇	FASC : FADD ₂ : FLIP[FLIP] _c → FASC : FADD ₂ : FLIP ₂ [] _c	k _{3f}
r ₅₈	FASC : FADD ₂ : FLIP ₂ [] _c → FASC : FADD ₂ : FLIP[FLIP] _c	k _{3r}
r ₅₉	FASC : FADD[CASP8] _c → FASC : FADD : CASP8[] _c	k _{3f}
r ₆₀	FASC : FADD : CASP8[] _c → FASC : FADD[CASP8] _c	k _{3r}
r ₆₁	FASC : FADD[FLIP] _c → FASC : FADD : FLIP[] _c	k _{3f}
r ₆₂	FASC : FADD : FLIP[] _c → FASC : FADD[FLIP] _c	k _{3r}
r ₆₃	FASC : FADD ₂ : CASP8 ₂ [] _c → FASC : FADD ₂ [CASP8 ₂ ^{P41}] _c	k ₄
r ₆₄	FASC : FADD ₃ : CASP8 ₃ [] _c → FASC : FADD ₃ : CASP8 ₂ [CASP8 ₂ ^{P41}] _c	k ₄
r ₆₅	FASC : FADD ₃ : CASP8 ₂ : FLIP[] _c → FASC : FADD ₃ : FLIP[CASP8 ₂ ^{P41}] _c	k ₄
r ₆₆	FASC : FADD ₃ : CASP8 ₂ [] _c → FASC : FADD ₃ [CASP8 ₂ ^{P41}] _c	k ₄
r ₆₇	[CASP8 ₂ ^{P41}] _c → [CASP8 ₂ [*]] _c	k ₅
r ₆₈	[CASP8 ₂ [*] , CASP3] _c → [CASP8 ₂ [*] : CASP3] _c	k _{6f}
r ₆₉	[CASP8 ₂ [*] : CASP3] _c → [CASP8 ₂ [*] , CASP3] _c	k _{6r}
r ₇₀	[CASP8 ₂ [*] , CASP3 [*]] _c → [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 químicas (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:

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

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

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

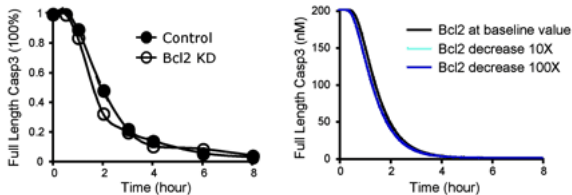
$$\mathcal{M}_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{45172}\}$$

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

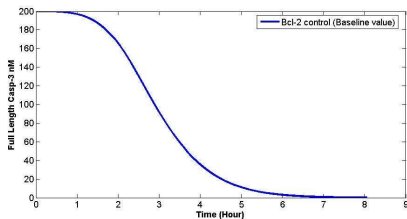
Valores obtenidos de: [F. Hua, M. Cornejo, M. Cardone, C. Stokes, D. Lauffenburger](#). Effects of Bcl-2 Levels on FAS Signaling-Induced Caspase-3 Activation: Molecular Genetic Tests of Computational Model Predictions. *The Journal of Immunology*, **175**, 2 (2005), 985–995.

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. sugieren⁴ que el tipo de vía elegido depende de la concentración de la **caspasa 8** activada:

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

Chequemos esta hipótesis en nuestro modelo:

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

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

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

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

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

Los resultados obtenidos muestran una activación más rápida de la caspasa 3.



⁴

Scaffidi, 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

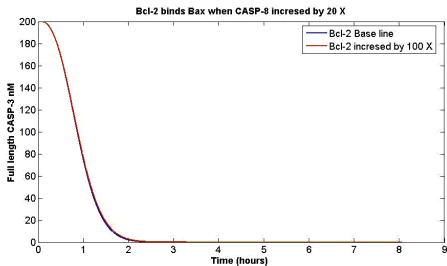
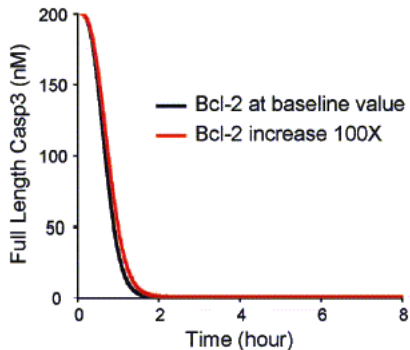
Se trata de estudiar la dependencia de la activación de la caspasa 3 respecto del número de moléculas de Bcl2

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 (de acuerdo con los resultados experimentales y con los obtenidos por F. Hua et al.).

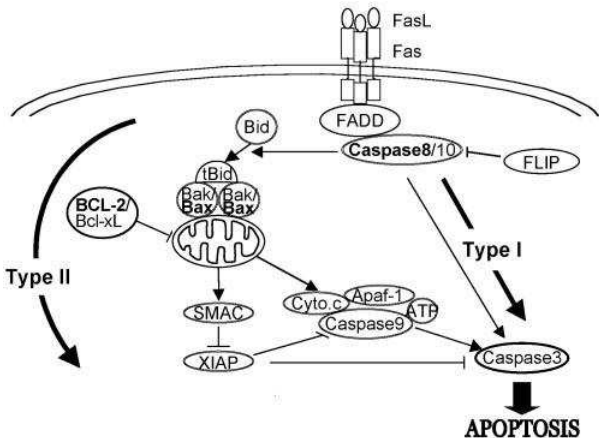
Resultados



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.



4. Eficiencia del bloqueo de la vía extrínseca por Bcl2

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:**

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

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:

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

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

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

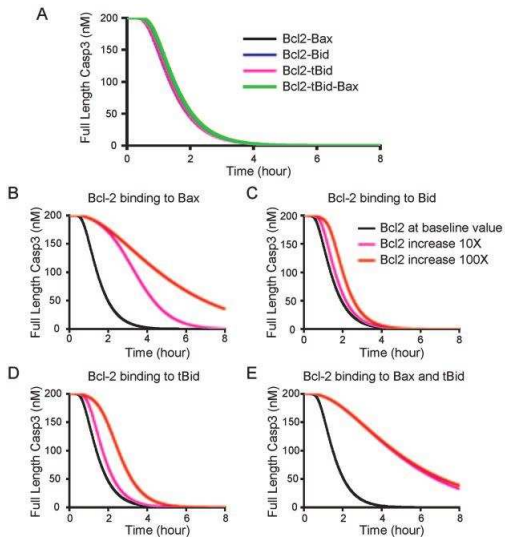
$$\mathcal{M}_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{45172}\}$$

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

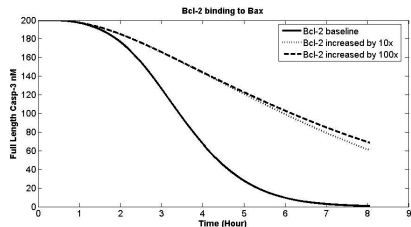
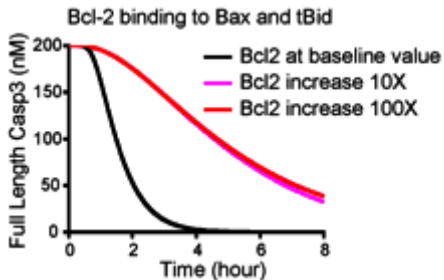
$$\mathcal{M}''_m = \{Smac^{60230}, Cyto.c^{60230}, Bcl2^{4517200}\}$$

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

Resultados



Resultados



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)	<i>In sensible</i>
Vía intrínseca (tipo II, mitocondria)	<i>Sensible</i>

V 3. Quorum Sensing en la bacteria *Vibrio Fisheri*

Quorum sensing: mecanismo de control de expresión de genes en función de la densidad celular ⁵.

Este fenómeno permite a una colonia de bacterias dar una respuesta coordinada.

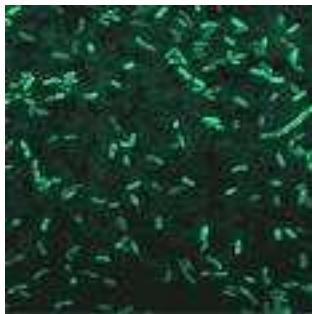
- ▶ Emisión de *luminiscencia* (*Vibrio Fischeri*)
- ▶ Secreción de *sustancias viscosas* provocando infecciones (*Pseudomona aeruginosa*, Gram negativa)
- ▶ Liberación de *toxinas* que matan a organismos que servirán de alimento (*Pfiesteria*)

La bacteria *Vibrio Fischeri* (I)

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

Vibrio Fischeri: una especie de bacteria bio-luminiscente.

La primera especie en la que se descubrió y se describió el ACYL-homoserina lactosa (la señal clave en el quorum sensing).



La bacteria *Vibrio Fischeri* (II)

Puede vivir:

- ▶ Librementemente en el plancton marino.
- ▶ En estado de simbiosis en un calamar (*Euprymna scolope*) o en ciertos peces.



▶ Aunque es poco frecuente, aparece como un patógeno en ciertos invertebrados.

La bacteria Vibrio Fischeri (III)

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

- ▶ **NO** en el plancton.
- ▶ **SÍ** en simbiosis.

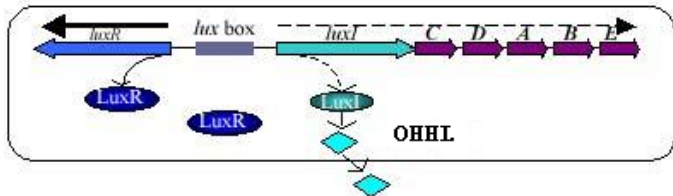
La producción de luz en el organismo anfitrión:

- ▶ Atraen a las presas.
- ▶ Permite acciones de camuflaje:
 - ▶ Durante la caza nocturna, los órganos de luminescencia se dirigen al fondo marino eliminando la sombra.

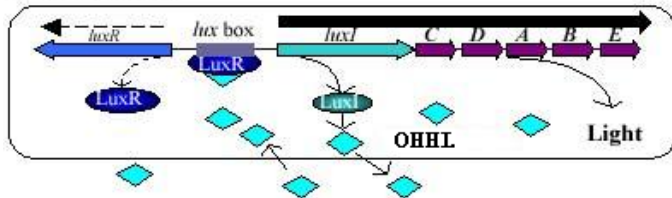
La bacteria *Vibrio Fischeri* (IV)

Mecanismo del Quorum Sensing en *Vibrio Fischeri* (K.H. Neilson y J.W. Hasting, 1979; K.L. Visic et al., 2000):

Low cell density



High cell density



- ▶ La región **Lux Box** del ADN de la bacteria produce proteína **Lux R** (que sintetizan receptores) y proteínas **Lux I** que sintetizan señales **OHHL**.
- ▶ Ese proceso se produce a niveles basales, con prioridad en el Lux R.
- ▶ Las señales se difunden al entorno (y entran en la bacteria) a través de la membrana plasmática.
- ▶ Cuando la concentración de señales en el interior supera una barrera:
 - ▶ 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:
 - ▶ Incremento en la producción de señales y receptores (ahora con prioridad a las señales).
 - ▶ La activación de un clúster de 5 genes.

Modelo del QS en la bacteria *Vibrio fischeri* basado en sistemas P^6

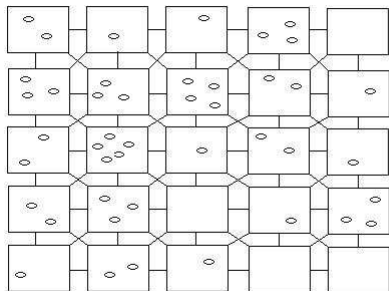
Sistema P multientorno de orden $(25, 1, N)$.

$$ME = (G, \Gamma, \Sigma, \Pi_1, \{c_r : r \in R_{\Pi_1}\}, E_1, \dots, E_{25}, \Pi_1, \mathcal{R}_E)$$

donde:

- ▶ G representa la estructura del multientorno (25 entornos).
- ▶ $\Gamma = \{\text{LuxBox}, \text{LuxR}, \text{LuxR.OHHL}, \text{LuxR.OHHL.LuxBox}, \text{OHHL}\}$.
- ▶ $\Sigma = \{\text{OHHL}\}$.
- ▶ $E_i = \emptyset$, para $i = 1, \dots, 25$.
- ▶ $\Pi_1 = (\Sigma, L, \mu, M_1, \mathcal{R}_1)$ en donde:
 - $L = \{b\}$.
 - $\mu = [\]$.
 - $M_1 = \{\text{LuxBox}\}$.

Estructura del modelo estocástico basado en sistemas P



Reglas de los sistemas Π_1 (bacterias): \mathcal{R}_1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Reglas de los entornos: \mathcal{R}_E

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

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

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

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

Constantes estocásticas asociadas a las reglas:

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

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

Resultados y Discusiones

- ▶ El modelo descrito ha sido representado en SBML, Systems Biology Markup Language ⁷.
- ▶ El código SBML fue generado usando CellDesigner ⁸.
- ▶ Semántica basada en el algoritmo determinista de tiempo de espera.
- ▶ 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 examinar cómo las bacterias pueden percibir la densidad celular.

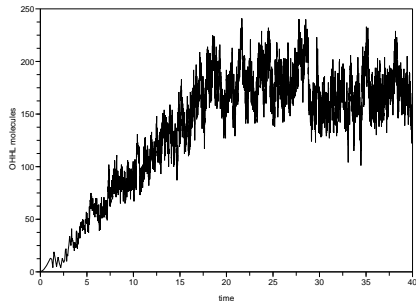
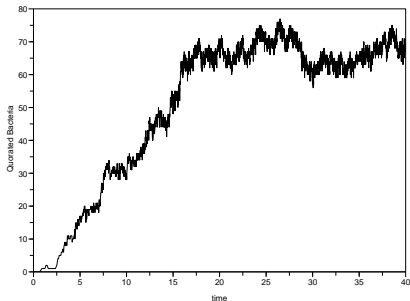


⁷ SBML Web Site <http://sbml.org/index.psp>

⁸ Cell Designer Web Site <http://www.celldesigner.org/>

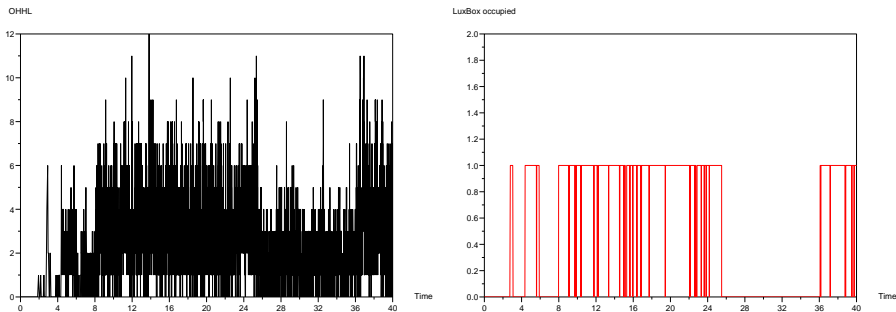
En primer lugar, hemos considerado una población de **100 bacterias**.

Evolución en el tiempo del número de bacterias quoradas y el número de señales OHHL en el entorno:



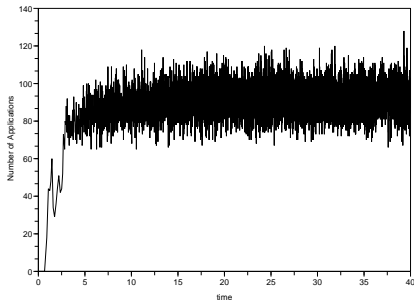
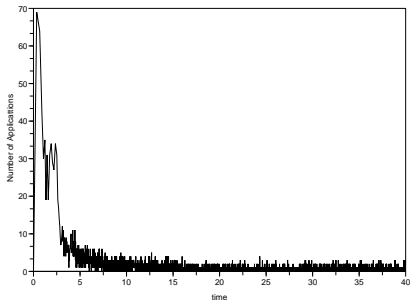
Número de bacterias excitadas (izquierda) y señales en el entorno (derecha)

Correlación entre el número de señales en el interior de **una** bacteria (izquierda) y la ocupación del LuxBox por el complejo (derecha):

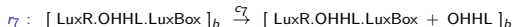
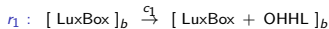


Número de señales y ocupación del LuxBox en **una** bacteria

Evolución del número de aplicaciones de la regla que representa la producción basal (izquierda) y la regla que representa la producción masiva de señales (derecha)

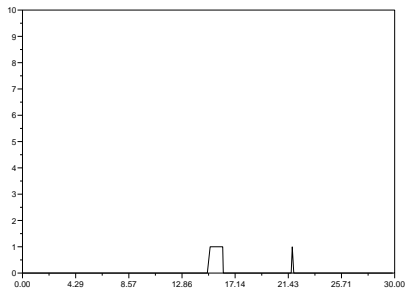


Número de aplicaciones de las reglas r_1 y r_7 en una población de 300 bacterias

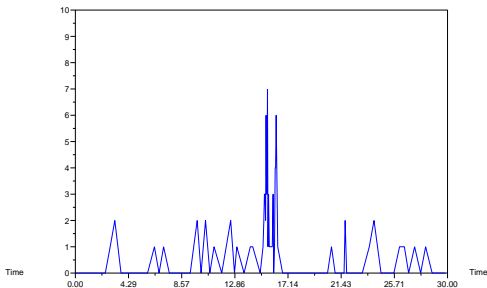


Se analiza cómo las bacterias perciben el número de individuos de la colonia, examinando el comportamiento de una población de **10 bacterias**.

Quorated Bacteria



OHHL



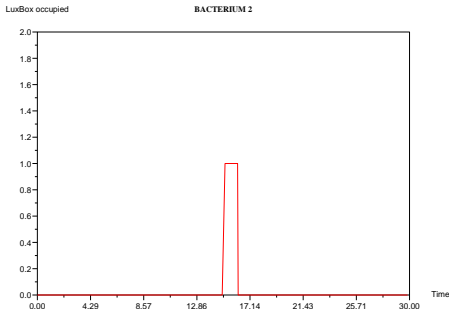
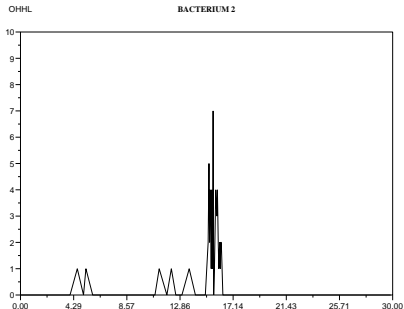
Bacterias excitadas y señales en el entorno en una población **10 bacterias**

En este caso, la señal no se acumula en el entorno. Sólo una bacteria es excitada conjeturando mal el tamaño de la colonia.

Se analiza el comportamiento de la bacteria que fue excitada.

La producción masiva de señales pasaban al entorno por difusión, en donde no habían suficientes bacterias para percibirlas.

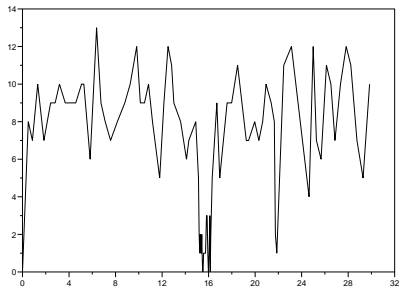
Cuando la bacteria percibe que la señal no se acumula en el entorno, entonces modifica su comportamiento y pasa a baja-regulación.



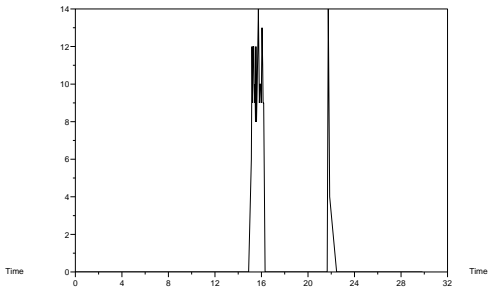
Comportamiento de la bacteria en una población de 10 bacterias

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

Number of Applications [LuxBox]b \rightarrow [LuxBox, OHHL]b



Number of Applications [LuxBox-LuxR-OHHL]b \rightarrow [LuxBox-LuxR-OHHL, OHHL]b



Número de aplicaciones de las reglas r_1 y r_7 en una población de 10 bacterias

- ▶ Los resultados que se deducen de nuestro modelo están de acuerdo con los resultados que se han obtenido experimentalmente en el laboratorio ⁹.

- ▶ Nuestra aproximación,
 - usando sistemas P multientorno con semántica derivada de una extensión del algoritmo de Gillespie,confirma la habilidad del sistema computacional para detectar conductas emergentes.