



*UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO*

FACULTAD DE CIENCIAS

DINÁMICA ESPACIO-TEMPORAL DE UNA TRAYECTORIA DE
TRANSDUCCIÓN CELULAR MAP KINASA GENERADA POR
GRADIENTES DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

FÍSICO

P R E S E N T A

JOSÉ LUIS MAYA BERNAL

DIRECTOR DE TESIS

DR. GUILLERMO RAMÍREZ SANTIAGO



2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Dedico mis agradecimiento a mis padres, hermanos y amigos por su apoyo constante. Al Dr. Guillermo Ramírez Santiago por la guía que me proporcionó al escribir esta tesis. A la Facultad de Ciencias y sus profesores por la dedicación y el apoyo que proporcionan a los alumnos y a la Universidad Nacional Autónoma de México en general.

Agradezco también el apoyo económico recibido a través del proyecto PAPIIT IN-118410 por parte de la DGAPA-UNAM.

Índice general

1. Introducción.	4
2. Modelo Cuantitativo de una vía de transducción celular.	13
2.1. Ecuaciones de Reacción-Difusión.	14
2.2. Cinética de Michaelis-Menten.	17
3. Modelo de una vía de transducción celular sin regulación	22
3.1. Estados estacionarios	27
4. Modelo de una vía de transducción celular con regulación.	40
4.1. Estados estacionarios	45
5. Evolución temporal de la vía de transducción.	56
6. Conclusiones	67

Resumen

El estudio de los sistemas de señalización celular ha sido desarrollado en los últimos años usando un enfoque matemático cuantitativo, en el que se considera que al interior de la célula el transporte pasivo de las proteínas ocurre mediante difusión. Con esta idea se ha estudiado la dinámica espacio-temporal y los estados estacionarios de las concentraciones de fosfo-proteínas para diferentes tipos de señales de entrada. Recientemente, Muñoz-García y colaboradores (2010) han propuesto y analizado un sistema de ecuaciones de reacción-difusión que simula la dinámica espacio-temporal de una cascada con N módulos en una dimensión espacial. No obstante, su modelo no considera términos de regulación que están presentes en las cascada de señalización reales. En esta tesis se analiza un modelo de seis ciclos, pensando en la cascada MAP Cinasa, en el que se incluyen dos términos de regulación negativa ejercidos por la cinasa ERK que actúan sobre dos componentes, SOS y Raf, río arriba en la cascada. Se analizan tres regímenes definidos por los valores del parámetro de regulación enzimática: (i) $\mu < 1$, (ii) $\mu = 1$ y (iii) $\mu > 1$. Se concluye que el escenario más favorable para que ocurra la transducción de la señal al núcleo es cuando, $\mu = 10$, que se puede relacionar con un consumo óptimo de energía. Este resultado es consistente con observaciones experimentales en células COS donde la concentración de ERK es seis veces mayor a la concentración de la cinasa Raf.

Capítulo 1

Introducción.

La célula es la unidad fundamental de la vida, capaz de reproducirse, desplazarse, crecer, sentir el medio que la rodea, y responder a estímulos. Todos estos procesos los realiza a través de reacciones bioquímicas específicas en una secuencia precisa, eficaz y eficiente, que han sido seleccionadas durante el proceso de evolución, a través de millones de años. Las macromoléculas que participan en estos procesos –y la más abundantes al interior de la célula– son las proteínas, que están compuestas por cadenas de aminoácidos que conforman un polipéptido en una combinación única formada de 20 posibles residuos en todos los organismos. Estas cadenas toman una forma tridimensional específica guiada por las fuerzas de atracción, repulsión y entrópicas entre los átomos de los residuos que las componen. Es así como todos los organismos vivos forman una gama amplia de productos tales como enzimas, hormonas, anticuerpos, transportadores, antibióticos, y un gran número de sustancias con actividades biológicas diversas [1].

En un contexto fisiológico, es en la célula donde ocurren todos los procesos básicos de la vida a nivel molecular y provee un sistema de referencia tanto en espacio como en tiempo que permite integrar y describir las diferentes familias de

proteínas, la composición genética, examinar el nivel de transcripción de los mensajeros ribonucleicos así como obtener la información biofísica y bioquímica de las moléculas de las que están hechos los seres vivos. Las células tienen diferentes formas y tamaños, y en organismos multicelulares realizan una función específica, por lo que se pueden clasificar en muchas clases o tipos. No obstante, todas las células eucariotas tienen algunas partes en común como son: la membrana, el citoplasma y el núcleo. La membrana celular es una membrana delgada semi-permeable constituida por lípidos y proteínas que contienen al citoplasma de la célula manteniendo todas sus partes internas integradas y controla el paso de moléculas hacia adentro y hacia afuera de ella. También sirve como base del citoesqueleto en algunos organismos o como pared celular en otros, contribuyendo a darle forma y plasticidad. El citoplasma está formado principalmente de agua y contiene enzimas, sales, y varias otras moléculas orgánicas, y en células eucariotas contiene algunos organelos tales como la mitocondria y los ribosomas. Dentro del citoplasma también se localiza el citoesqueleto que da forma y plasticidad a la estructura de la célula. El núcleo de las células eucariotas contiene el ADN, el material genético de la célula. El ADN contiene la información necesaria para direccionar una gran variedad de tareas de síntesis que realiza la célula como parte básica del proceso de la vida, incluyendo el proceso de reproducción. En especial, las enzimas son los componentes fundamentales que catalizan a las reacciones químicas al interior de la célula. Las enzimas son proteínas o complejos proteínicos, en ocasiones combinados con iones metálicos y/o moléculas simples denominadas cofactores. Las enzimas tienen varias partes especializadas para interactuar con los sustratos, por ejemplo, los sitios activos, los sitios de regulación y los sitios de unión covalente. El sitio activo, tiene la conformación estructural necesaria para la unión con su sustrato y tiene las propiedades electroquímicas apropiadas para lograr que ocurra una reacción bio-

química específica en el interior de la célula. La combinación de aminoácidos única que conforma una proteína está codificada en el material genético de la célula, y la transcripción y la traducción de esta información se realiza a partir de complejos proteínicos que interactúan con el ADN. Las interacciones entre el ADN y las proteínas han evolucionado para responder a los cambios de concentración de algunos complejos químicos vitales o señalizadores tanto en el interior como en el exterior de cada célula.

La transducción de señales del medio extracelular al interior de la célula se origina en la membrana celular en cuya superficie se localiza una gran cantidad de diferentes proteínas receptoras. Estos receptores están especializados para reconocer señales bioquímicas extracelulares específicas, –ligandos–, como son: hormonas, factores de crecimiento, nutrientes, etcétera. La función de los receptores es de reconocer y unirse eventualmente a moléculas que se localizan en el exterior de la célula para generar una señalización interna que produzca una respuesta específica. La especificidad entre receptor y ligando es debida a una complementariedad estructural que es mediada por fuerzas de Van der Waals. La unión con el ligando induce la activación del dominio efector, que se une con el siguiente elemento en el proceso de señalización. Dependiendo del dominio efector, ésta unión puede ser covalente o no covalente. Los tres tipos de receptores más comunes son [2]:

- **Receptores acoplados GTPasa:** Tienen una estructura característica de siete dominios transmembranales y se activan a través de la vía de transducción de proteína G, que produce segundos mensajeros.
- **Receptores acopladas a proteína Cinasa o Fosfatasa .** Se encuentran al menos como dímeros, y se activan unos a otros por trans-autofosforilación o -defosforilación. Existen tres tipos de receptores cinasa:

- Histidina cinasa, que se encuentra principalmente en células procariotas.
 - Cinasa Serina/Treonina, abundante en todos los organismos.
 - Cinasa Tirosina, que hasta ahora se ha encontrado solamente en células animales.
- **Receptores acoplados a canales iónicos.** Tienen uno o más sitios de unión y se encuentran tanto en células eucariotas como procariotas.

La presencia de un “ligando” en el medio extracelular se transmite al interior de la célula a través de un cambio en la conformación de la proteína receptora, proceso que ocurre en una escala de longitud nanométrica. La información codificada en el cambio de la conformación de la proteína receptora debe transmitirse en la escala de longitud del tamaño de las células que es del orden de micrómetros.

Para que sea posible la amplificación y la transmisión de la señal al interior de la célula debe ocurrir un “mecanismo de acoplamiento” de estas dos escalas de longitud: la formación de una vía de transducción celular, que consiste de una serie de “reacciones químicas en cascada” localizadas al interior de la célula, que ocurren como consecuencia del movimiento molecular. En algunas vías de señalización, los procesos de amplificación y transmisión de la señal ocurren cuando el receptor activado, mediante la acción de un ligando, cataliza la activación de muchas moléculas de una segunda enzima, y cada una de las cuales activa a muchas moléculas de una tercera enzima, y así sucesivamente [1]. El mecanismo básico de este proceso de transmisión de la señal bioquímica es la activación de la molécula *A* que activa a la molécula *B* la que activa una molécula *C*, etc., mediante un mecanismo de transporte molecular que en el caso más simple es un proceso de

difusión. A este proceso de transmisión de la señal se le denomina transducción celular. Los tipos de modificación para la activación de las proteínas son: por fosforilación, por oxidación, por metilación, por acetilación o por defosforilación, procesos que ocurren en uno o más residuos de una enzima [3]. En el caso más común es la fosforilación de proteínas en la que las cinasas y fosfatasas producen la activación y desactivación de proteínas, adhiriendo o removiendo un grupo fosfato, respectivamente. Las células animales expresan un número enorme de proteínas cinasas que son responsables de la fosforilación como mecanismo de transmisión. Existen series de cinasas que se fosforilan unas a otras para establecer la cascada de señalización [3].

En un mamífero típico se han identificado más de 100 señales moleculares extracelulares que se transmiten al interior de la célula a través de diversas vías de transducción de la señal para que ésta llegue a su objetivo final, que puede ser el núcleo celular o algún objetivo en el citoplasma. Entre las vías que llegan al núcleo, existe una familia altamente conservada entre los Receptores Tirosina Cinasa (RTK, por sus siglas en inglés), que es la activación de la vía de transducción MAP Cinasa, mitógeno activado por proteína cinasa, (MAPK, por sus siglas en inglés). La MAP Cinasa puede fosforilar diferentes proteínas, incluyendo factores de transcripción que regulan la expresión de ciclos celulares importantes así como proteínas de diferenciación específica [4]. Hasta ahora se han identificado cinco distintas cascadas de señalización MAPK y se han denominada de acuerdo a las componentes en cada nivel de la cascada MAPK [2]. Estas cascadas son:

- Cinasa regulada por señal extracelular (ERK)
- Cinasa Jun N-terminal (JNK)

- p38MAPK
- Gran MAPK también conocida como ERK5
- ERK7

La activación de la vía ERK/MAPK ocurre mediante una cascada de fosforilación de proteínas cinasa que operan en una secuencia posterior a la activación de la subfamilia “Sarcoma de Rata” (Ras, por sus siglas en inglés). La activación de esta cascada en dos células diferentes que dependiendo de la especificidad de la célula puede conducir a respuestas similares o totalmente diferentes; de igual modo, ligandos diferentes pueden activar la misma cascada ERK en algunas células.

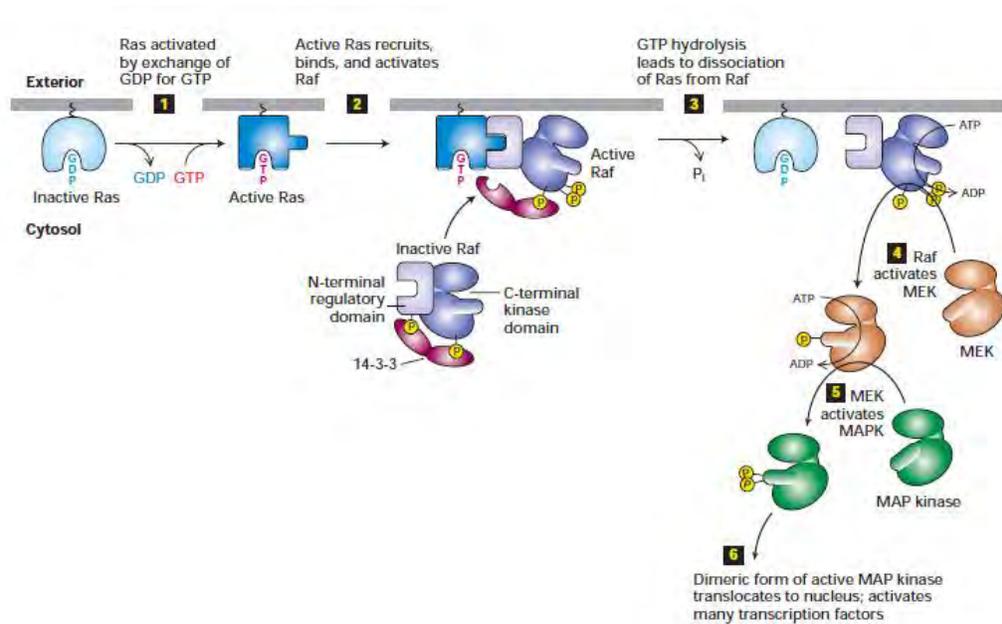


Figura 1.1: Esquema de la activación de la cascada de señalización MAPK Cinasa.

En la figura (1.1) se muestra el esquema de activación de la cascada MAPK. En el primer ciclo o módulo, se activa Ras mediante el intercambio de GDP por GTP,

en el segundo ciclo, la molécula activa de Ras, Ras-GTP se une a la Terminal N del dominio regulatorio de Raf activando la molécula. En el tercer ciclo, el proceso de hidrólisis de Ras-GTP a Ras-GDP libera la molécula de Raf activada, la que en el ciclo siguiente, cuarto ciclo, fosforila y así activa la proteína MEK. Posteriormente en el quinto ciclo, la molécula MEK activada fosforila y activa de esta forma a la cinasa, MAPK. Finalmente, en el sexto ciclo, la forma dimérica de la cinasa MAPK se transporta al núcleo donde fosforila diferentes proteínas, incluyendo factores de transcripción nuclear, que definen la respuesta celular [4].

En algunos casos, diferentes niveles de una cascada se cruzan o interconectan con las componentes de otras cascadas regulando la señal de la vía de transducción de interés, de manera positiva o negativa. La regulación mutua de dos componentes se denomina retroalimentación y puede ser positiva, si contribuye a aumentar la concentración de alguna de las componentes de la cascada, o bien, puede ser negativa si contribuye a disminuir la concentración de alguna de las componentes de la cascada. La regulación más común que se observa en las células es la retroalimentación negativa tanto en sus vías metabólicas como en las cascadas de señalización multienzimática. Algunos ejemplos de mecanismos de regulación negativa que se oponen a la propagación de la señal son: las fosfatasas MKP-1, MKP-2, MKP-3 y PAC-1 que catalizan la desactivación de la cascada ERK por desfosforilación. Es importante notar que la mayoría de los procesos de señalización son muy complicados debido a la comunicación entre las vías de señalización, lo que se conoce como una "red de transducción celular."

De acuerdo con lo anterior, la determinación de las propiedades *in vivo* de las biomoléculas, en particular de las proteínas, es un paso crucial para analizar sus funciones y descubrir los mecanismos involucrados en los diferentes procesos ce-

lulares. La movilidad de las proteínas en general es muy heterogénea, tanto en su localización espacial como temporal. Debido a esto se requieren diferentes métodos de microscopía de alta resolución para obtener un mapa de la distribución y movilidad de las proteínas en la célula. El análisis de las fluctuaciones de las concentraciones locales mediante diferentes métodos de microscopía fluorescente provee información relacionada con la movilidad de las moléculas marcadas, sus propiedades de difusión y sus concentraciones absolutas lo que permite la cuantificación de la dinámica espacio-temporal de los procesos de transducción celular. La dinámica temporal y el estado estacionario de las concentraciones de señalización por simulaciones computacionales ha sido extensamente analizado, iniciando con la simulación numérica de Stadman y Chock [5], y seguidos por una exploración teórica de las respuestas de los estados estacionarios de entrada y salida por un ciclo de señalización realizada por Goldbeter y Koshland [6]. La distribución espacial de proteínas en una cascada de señalización del tipo MAP Kinasa ha sido estudiada matemática y computacionalmente por Muñoz-García y colaboradores [7], mostrando que una cascada de proteínas cinasa forma gradientes de concentraciones que podrían ser relevantes para la división celular. Sin embargo, en su modelo propuesto no considera mecanismos de retroalimentación, algunos observados *in vivo* [8].

La señalización celular, al igual que otros entes biológicos, han desarrollado mecanismos de retroalimentación, de prevención y de restauración que los mantienen en un estado óptimo de funcionamiento– homeostasis–. Una cascada sin mecanismos de desactivación puede promover la proliferación celular desmedida asociada a enfermedades como el cáncer; y una regulación con mecanismos de desactivación excesiva puede aniquilar las señales externas impidiendo la comu-

nicación. Por lo tanto los mecanismo de regulación deben promover que la cascada de señalización se mantenga en un estado homeostático, y que se pueda transmitir de manera eficiente. En la célula se han estudiado extensamente los mecanismo de regulación existentes en los procesos metabólicos y se han observado estos mecanismos en algunas vías de señalización. Las moléculas que componen una vía de señalización son reguladas por la concentración de sustancias o la expresión genética influenciada por una molécula de la misma vía o de una diferente.

El objetivo de esta tesis, es desarrollar un modelo cuantitativo que describa la dinámica espacio-temporal de una cascada de transducción celular con seis ciclos de modificación covalente con un mecanismo de retroalimentación negativa. Cada ciclo corresponde a la concentración de una de las componentes de la MAP Kinasa, el sexto simula la activación de un factor de transcripción que es fosforilado por la proteína MAPK. Primero se analiza el modelo sin retroalimentación, similar al modelo introducido por Muñoz-García y colaboradores [7], para estudiar las condiciones bajo las que ocurre transmisión de la señal en los tres casos de concentraciones: menores al valor de K_M , es decir, en la región no-saturada, iguales al valor de K_M y en el caso de saturación enzimática, valores de las concentraciones mucho mayores a K_M . Posteriormente se incluye en el modelo el término de regulación o retroalimentación negativa entre las proteínas cinasa. Esto es similar al de un dispositivo electrónico en el que la corriente de salida regula la corriente de entrada, eliminando el ruido de entrada, haciendo más robusta la señal. El sistema de ecuaciones acopladas de reacción-difusión se resuelve numéricamente usando rutinas de la biblioteca IMSL y el código del programa se escribe en lenguaje Fortran 90.

Capítulo 2

Modelo Cuantitativo de una vía de transducción celular.

En esta tesis se plantea un modelo matemático simplificado en donde el movimiento molecular ocurre mediante la difusión de proteínas y se analiza en detalle la dinámica espacio-temporal de una vía de transducción compuesta de seis ciclos básicos. Cada ciclo consiste de una enzima “activadora” que cambia la conformación de la proteína que lleva la señal codificada y de otra enzima “inhibidora” que al encontrarse con la proteína “activada” la regresa a su estado de conformación original, en donde se ignoran los efectos de síntesis, degradación y secuestro de proteínas. Específicamente se propone un conjunto de ecuaciones de reacción-difusión para describir el comportamiento de la concentración como una función de las coordenadas espaciales y del tiempo. El ejemplo típico de esta vía de transducción o señalización celular lo constituye el proceso de fosforilación-defosforilación de una proteína, presente en la mayoría de los procesos de transducción celular. El proceso de fosforilación consiste en la adición de fosfato a una molécula orgánica, por ejemplo, la fosforilación puede consistir en la adición de

fosfato al ADP (difosfato de adenosina) para producir ATP (trifosfato de adenosina). La fosforilación se realiza mediante la acción de enzimas conocidas como cinasas. Por otra parte, el proceso de defosforilación consiste en la remoción del grupo fosfato de la molécula orgánica mediante el proceso de hidrólisis.

En la siguiente subsección se presenta el modelo matemático considerando que las enzimas se transportan dentro de la célula mediante difusión. También se introducen términos que describen las reacciones enzimáticas de activación e inhibición. El sistema de ecuaciones resultante se denomina de "Reacción-Difusión".

2.1. Ecuaciones de Reacción-Difusión.

Un sistema de ecuaciones de Reacción-Difusión describe la difusión de diferentes especies moleculares localizadas dentro de un volumen V , incluyendo términos que describen la cinética de las posibles reacciones químicas entre diferentes especies moleculares. La concentración de la especie i , $C_i(\vec{r}, t)$, representa la cantidad de moléculas, N_i , de la especie i , en la posición \vec{r} , al tiempo t , dentro del volumen V y se define como: $C_i = N_i/V$. Formalmente un sistema de ecuaciones de reacción-difusión se escribe como:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_i \vec{\nabla}^2 C_i + F_i(C_1, \dots, C_n), \quad i = 1, 2, \dots, n, \quad (2.1)$$

donde D_i representa el coeficiente de difusión de la especie i y tiene un valor positivo. Este es un conjunto de n ecuaciones diferenciales parciales acopladas en la variable $C_i(\vec{r}, t)$, donde $F_n(C_1, \dots, C_n)$ es una función que depende de las concentraciones de cada especie molecular, C_i , y es una medida de la tasa a la cual la especie i se crea o se destruye debido a las reacciones químicas entre diferentes es-

pecies [9]. Suponiendo que cada especie molecular satisface la ley de Fick de forma independiente de las otras especies, se puede escribir una relación para el flujo, \vec{J}_i , de cada especie.

$$\vec{J}_i = -D_i \vec{\nabla} C_i \quad (2.2)$$

Aplicando el teorema de la divergencia se obtiene la ecuación de la conservación de masa de la especie i :

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = -\vec{\nabla} \cdot \vec{J}_i + F_i(C_1, \dots, C_n). \quad (2.3)$$

Para analizar la dinámica espacio-temporal de las concentraciones de las proteínas que participan en la vía de señalización celular se escribieran las ecuaciones cinéticas específicas para la proteína activada y para la inhibida o desactivada de acuerdo con la referencia [7]. Considerando una cascada de seis ciclos o módulos donde ν_n^{cin} representa la tasa de activación catalizada por cinasas y ν_n^{fos} representa la tasa de desactivación catalizada por la fosfatasa, las ecuaciones que describen la dinámica de las concentraciones de las proteínas activadas, C_i^{act} , se escriben:

$$\frac{\partial C_1^{act}}{\partial t} = D \vec{\nabla}^2 C_1^{act} - \nu_1^{fosf} \quad (2.4)$$

$$\frac{\partial C_n^{act}}{\partial t} = D \vec{\nabla}^2 C_n^{act} + \nu_n^{cin} - \nu_n^{fosf}, \quad (2.5)$$

donde $n = 2, 3, 4, 5, 6$ y por simplicidad se considera que los coeficientes de difusión de las enzimas participantes tiene el mismo valor, es decir, $D_i = D$. Es importante notar que la primera ecuación del sistema no tiene el término que corresponde a la tasa de fosforilación, ν_1^{cin} , debido a que la cinasa del primer ciclo se

fosforila en la membrana celular. Se supondrá que los términos de reacción están descritos por la cinética enzimática de Michaelis-Menten. Para simplificar la solución de las Ecs. 2.4, 2.5 consideraremos una célula con geometría esférica, es decir, supondremos que las concentraciones, C_i^{act} , dependen solamente del radio de la célula. Las condiciones de frontera están relacionadas con el flujo de moléculas en la membrana celular, $r = L$, y en el núcleo, $r = 0$, es decir,

$$D \frac{\partial C_1^{act}}{\partial r} \Big|_{r=L} = -\nu_1^{cin}, \quad D \frac{\partial C_1^{act}}{\partial r} \Big|_{r=0} = 0 \quad (2.6)$$

$$D \frac{\partial C_n^{act}}{\partial r} \Big|_{r=0} = 0, \quad D \frac{\partial C_n^{act}}{\partial r} \Big|_{r=L} = 0 \quad (2.7)$$

en el primer ciclo, el flujo difusivo en la membrana es igual a la tasa de fosforilación superficial mientras que los flujos en cualquiera de los otros ciclos son cero tanto en la membrana como en el núcleo. Además, se considera que al tiempo inicial, $t = 0$, no hay proteínas activadas, es decir, $C_i^{act}(x, 0) = 0$, con $i = 1, 2, \dots, 6$. Con la finalidad de simplificar aún más el análisis del sistema se utilizarán términos de difusión en una dimensión cartesiana, en donde se desprecian los efectos relacionados con la curvatura. Este cambio no afecta de manera significativa los resultados del análisis. Considerando esto último el sistema de ecuaciones se reescribe como:

$$\frac{\partial C_1^{act}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_1^{act}}{\partial x^2} - \nu_1^{fosf} \quad (2.8)$$

$$\frac{\partial C_n^{act}}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C_n^{act}}{\partial x^2} + \nu_n^{cin} - \nu_n^{fosf}$$

donde se ha sustituido la coordenada r por la coordenada cartesiana x , y por

conveniencia se redefine la posición de la membrana en, $x = 0$, y la del núcleo en $x = L$. Así pues, con la nueva variable x , y el ajuste en las posiciones de la membrana y el núcleo las condiciones de frontera se reescriben como:

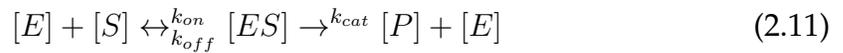
$$D \frac{\partial C_1^{act}}{\partial x} \Big|_{x=0} = -\nu_1^{cin}, \quad D \frac{\partial C_1^{act}}{\partial r} \Big|_{x=L} = 0 \quad (2.9)$$

$$D \frac{\partial C_n^{act}}{\partial x} \Big|_{x=0} = 0, \quad D \frac{\partial C_n^{act}}{\partial x} \Big|_{x=L} = 0 \quad (2.10)$$

2.2. Cinética de Michaelis-Menten.

Las enzimas son la maquinaria básica que hace que ocurran las reacciones químicas en las células vivas y están formadas por cadenas de aminoácidos con longitudes que varían entre varios cientos y miles. Estas cadenas se doblan sobre sí mismas e interactúan con otras proteínas para formar una gran variedad de estructuras. La estructura y cualquier modificación subsecuente de estas cadenas de aminoácidos gobiernan la función de las enzimas que son necesarias en los organismos vivos. Las reacciones químicas usualmente requieren de energía de activación, que es la energía necesaria para formar el estado de transición entre reactantes y productos. Una reacción energéticamente favorable puede pasar de reactantes a productos, pero no necesariamente ocurrirá con rapidez. En realidad es la energía de activación la que determina la tasa a la que procederá la reacción. La energía de activación, E_o y la constante cinética, k , se relacionan a través de la ecuación de Arrhenius, $k = A \exp(-E_o/RT)$, donde A es una constante empírica que depende de la reacción, R es la constante universal de los gases y T es la temperatura expresada en grados Kelvin. Las enzimas estabilizan los estados de

transición de las reacciones y en consecuencia disminuyen la energía de activación necesaria para que éstas ocurran. La cinética enzimática de Michaelis-Menten se basa en el concepto de que la enzima forma un complejo no-covalente con su sustrato antes de catalizar la reacción para posteriormente disociarse del producto como se muestra en el siguiente esquema de reacción:



donde k_{on} es una tasa constante asociada a la unión entre la enzima y el sustrato; k_{off} es una tasa constante de la disociación del complejo ES , liberando a la enzima y al sustrato; y k_{cat} es una tasa constante de la disociación del complejo ES en la enzima libre y el producto. La primera es una reacción reversible entre la enzima y el sustrato y la segunda es una reacción en una sola dirección. De acuerdo con la ley de acción de masas, la tasa de cambio de la reacción es proporcional al producto de las concentraciones de los reactantes, por lo tanto, obtenemos las siguientes ecuaciones:

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_{on}[E][S] + k_{off}[ES] \quad (2.12)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_{on}[E][S] + (k_{off} + k_{cat})[ES] \quad (2.13)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{on}[E][S] - (k_{off} + k_{cat})[ES] \quad (2.14)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{cat}[ES] \quad (2.15)$$

Es la tasa de cambio del producto $[P]$, –última ecuación–, la que debe resolverse como función de las concentraciones. La penúltima ecuación, describe el cambio de $[ES]$, y es la más importante para nuestro propósito. En la mayoría de los casos la concentración $[ES]$ después de una fase de rápido crecimiento, se aproxima rápidamente a un estado estable en el que su concentración permanece casi constante hasta que se consuma la mayoría del sustrato [1]. La aproximación usual para esta ecuación, introducida por Briggs y Haldane, considera que la etapa inicial del complejo $[ES]$, se forma muy rápido después de la cual se encuentra esencialmente en equilibrio, es decir:

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0$$

Para determinar la tasa de formación del producto, es necesario reorganizar la ecuación de la concentración $[ES]$. Sabemos que la concentración de la enzima $[E]$ es igual a la concentración total $[E]_{tot}$ menos la concentración $[ES]$, por lo que resulta:

$$k_{on}([E]_{tot} - [ES])[S] = (k_{off} + k_{cat})[ES] \quad (2.16)$$

Lo que da como resultado:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{cat} \frac{[E]_{tot}[S]}{\left(\frac{k_{off} + k_{cat}}{k_{on}}\right) + [S]} \quad (2.17)$$

Así pues, la tasa de formación del producto es una función no lineal del sustrato. El término $V_{max} = k_{cat}[E]_{tot}$ representa la velocidad máxima de reacción para concentraciones del sustrato saturadas; mientras que el término $K_M = \frac{k_{off} + k_{cat}}{k_{on}}$, es

la concentración para la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima [1].

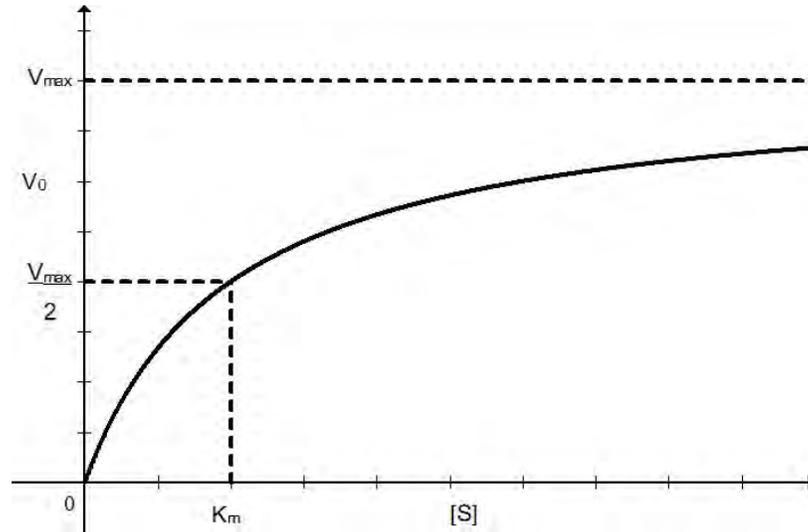


Figura 2.1: Concentración vs Velocidad de reacción.

Para el modelo de cascada de señalización por proteínas cinasa mediante fosforilación, podemos ajustar las tasas de la activación de las cinasas y las fosfatasa a la cinética de Michaelis-Menten. En el caso de la fosforilación, se considera como enzima catalizadora a la cinasa activada de nivel superior en la cascada, como sustrato a la cinasa inactiva del nivel siguiente y a esta cinasa ya activada como el producto.

$$v_j^{cin} = k_{cat}[C_{j-1}^{act}] \frac{[C_j^{ina}]}{K_{M,j}^{cin} + [C_j^{ina}]} \quad (2.18)$$

En la desfosforilación se considera como enzima a la fosfatasa, y como sustrato y producto a la cinasa activada sobre la cual actúa y a esta misma cinasa inactiva respectivamente.

$$v_n^{fos} = V_{max,n}^{fos} \frac{[C^{act}]}{K_{M,n}^{fos} + [C^{act}]} \quad (2.19)$$

Debido a que en el modelo consideramos como constantes a las concentraciones de las fosfatasas, este término se incluye en el parámetro $V_{max,n}^{fos}$.

Capítulo 3

Modelo de una vía de transducción celular sin regulación

En este capítulo se analiza la dinámica de una cascada de fosforilación-defosforilación con seis ciclos de modificación, de una forma activa a una inactiva, mediante el análisis de las soluciones estacionarias, –estados estacionarios–, de las ecuaciones. Para ello se resuelven numéricamente las ecuaciones de reacción-difusión sujetas a las condiciones de frontera descritas en el capítulo anterior. Ignorando los procesos de síntesis, degradación y secuestro de proteínas, la concentración total de cada cinasa se puede considerar constante a través de la célula, así pues se tiene la siguiente relación:

$$C_n^{total}(x, t) = C_n^{ina}(x, t) + C_n^{act}(x, t) \quad (3.1)$$

Estas concentraciones miden la cantidad de moléculas en cada posición, x , al interior de la célula. La dinámica espacio-temporal de las concentraciones de las cinasas activadas, normalizadas a la concentración total, $C_n^{total}(x, t)$, está descrita

por las siguientes ecuaciones de reacción-difusión:

$$\begin{aligned}\frac{\partial c_1}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - k_1^i \frac{c_1}{1 + \frac{c_1}{m_1^i}} \\ \frac{\partial c_j}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 c_j}{\partial x^2} - k_j^i \frac{c_j}{1 + \frac{c_j}{m_j^i}} + k_j^a \frac{(1 - c_j)c_{j-1}}{1 + \frac{1-c_j}{m_j^a}}.\end{aligned}\quad (3.2)$$

donde se ha incorporado la cinética de Michaelis-Menten en los términos correspondientes a reacciones químicas. En éstas ecuaciones, $k_j^i = V_{max,j}^{fos}/K_{M,j}^{fos}$ son la actividad de las fosfatasa del sustrato j , y $k_1^a = V_{max,1}^{cin}/K_{M,1}^{cin}$ y $k_j^a = V_{max,j}^{cin}/K_{M,n}^{cin}$ representan la actividad de las cinasas del sustrato j . Estas últimas actividades determinan la escala temporal de la reacción. La velocidad máxima de reacción de las cinasas es, $V_{max,j}^{cin} = k_{cat,j}^{cin} C_{j-1}^{total}$, y las constantes de Michaelis adimensionales para las fosfatasa y las cinasas quedan definidas como, $m_j^i = K_{M,j}^{fos}/C_j^{total}$, y $m_j^a = K_{M,j}^{cin}/C_j^{total}$, respectivamente. Bajo estas condiciones las concentraciones normalizadas c_j representan la fracción de proteína activada en una posición x al interior de la célula para cada nivel de la cascada.

Para la cinasa correspondiente al primer ciclo de la cascada el flujo de entrada en la posición de la membrana, $x = 0$, es igual a la tasa de fosforilación en la superficie de la membrana, ν_1^{cin} , y es cero en el polo opuesto, $x = L$, localizado en el núcleo. La tasa ν_1^{cin} y la velocidad de reacción $V_{max,1}^{cin}$ tienen unidades de flujo ($\mu m/s$) debido a la naturaleza superficial de los receptores. Para las cinasas en los ciclos o niveles subsecuentes de la cascada no hay flujo en ninguno de los dos polos.

$$D \frac{\partial c_1}{\partial x} \Big|_{x=0} = -k_1^a \frac{1 - c_1}{1 + \frac{1-c_1}{m_1^a}} \quad (3.3)$$

$$\frac{\partial c_1}{\partial x} \Big|_{x=L} = 0 \quad (3.4)$$

$$\frac{\partial c_n}{\partial x} \Big|_{x=0} = 0 \quad (3.5)$$

$$\frac{\partial c_n}{\partial x} \Big|_{x=L} = 0. \quad (3.6)$$

Los parámetros cinéticos de Michaelis, m^a y m^i , están relacionados con la concentración total del sustrato, C_n^{total} , y las constantes de Michaelis-Menten, $K_{M,j}^{cin}$ y $K_{M,j}^{fos}$, en una correspondencia tal que si, $C_j^{total} < K_{M,j}^{cin}$, entonces, $m^a > 1$, considerada región de valores lejana a la saturación de la cinasa, y si, $C_n^{total} > K_{M,n}^{cin}$, entonces $m^a < 1$, denominada saturación de la cinasa. Análogamente, para la cinética de la fosfatasa si $C_j^{total} < K_{M,j}^{fos}$, entonces, $m^i > 1$, que corresponde a una región lejana a la saturación de la fosfatasa, y finalmente, si $C_j^{total} > K_{M,j}^{fos}$, entonces $m^i < 1$, que corresponde a una región de valores de saturación de la fosfatasa. Las cinéticas enzimáticas de las componentes antagónicas se pueden visualizar en las gráficas (3.1).

Se observa que en éste sistema, la ecuación correspondiente al primer nivel no esta acoplada a los otros niveles y es independiente de ellos. En la región lejana a la saturación, concentraciones mucho menores a K_M , la primera ecuación tiene tasas lineales y se puede obtener analíticamente la solución correspondiente al estado estacionario. Esta solución se expresa en términos de la suma de funciones

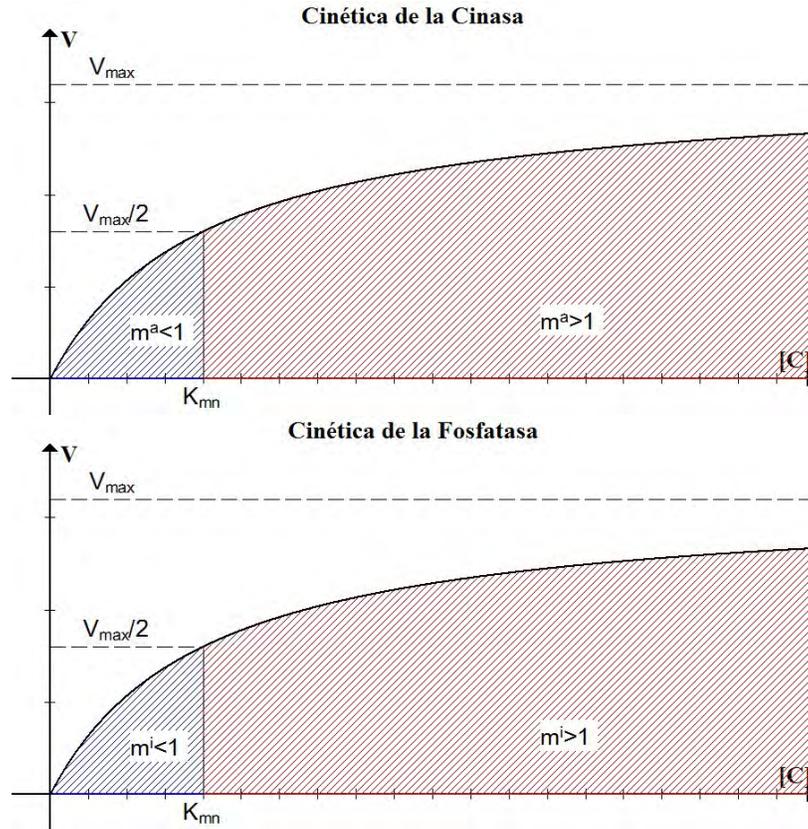


Figura 3.1: Cinética enzimática de las cinasas y las fosfatasa, donde V ($\frac{mol}{seg}$) es la velocidad de reacción y $[C]$ (mol) es la concentración del sustrato. Se visualizan las regiones de valores lejanos a la saturación, en azul, y de saturación, en rojo, con respecto a $K_{m,i}$ para los parámetros m^a y m^i .

exponenciales con una longitud de decaimiento, α^{-1} , definida como:

$$\frac{1}{\alpha} = \sqrt{\frac{D}{k_1^i}} \quad (3.7)$$

La solución estacionaria se estudia en el apéndice I de esta tesis. Las ecuaciones se pueden escribir en forma adimensional utilizando el parámetro α^{-1} , como longitud característica y una escala temporal definida por la constante cinética de las cinasas, $1/k^a$. Con estas consideraciones las ecuaciones 3.2 se reescriben como:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = \gamma \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - \gamma \frac{c_1}{1 + \frac{c_1}{m_1^i}}, \quad (3.8)$$

$$\frac{\partial c_j}{\partial t} = \gamma \frac{\partial^2 c_j}{\partial x^2} - \gamma \frac{c_j}{1 + \frac{c_j}{m_j^i}} + \frac{(1 - c_j)c_{j-1}}{1 + \frac{1-c_j}{m_j^a}}. \quad (3.9)$$

con las condiciones de frontera:

$$\frac{\partial c_1}{\partial x} \Big|_{x=0} = -\nu \frac{1 - c_1}{1 + \frac{1-c_1}{m_1^a}}, \quad \frac{\partial c_1}{\partial x} \Big|_{x=L} = 0, \quad (3.10)$$

$$\frac{\partial c_j}{\partial x} \Big|_{x=0} = 0, \quad \frac{\partial c_j}{\partial x} \Big|_{x=L} = 0. \quad (3.11)$$

Es importante notar que las ecuaciones anteriores describen el comportamiento dinámico de las concentraciones normalizadas de las proteínas activadas. Además, se ha considerado por simplicidad, que la actividad de las fosfatasa es la misma entre los diferentes niveles de la cascadas, al igual que la actividad de las cinasas. En estas ecuaciones el parámetro, $\gamma = \frac{k^i}{k^a}$, es clave, y representa el cociente entre la actividad de la fosfatasa y la cinasa, que pueden ser diferentes entre si. El parámetro, $\nu = \frac{k^a}{(k^i D)^2}$, define la intensidad de la señal en la membrana y determina la concentración, $c_1(0) = \frac{\nu}{(1+\nu)}$, de la cinasa activada en el primer nivel de fosforilación en la membrana.

En la región de valores lejana a la saturación, $m_n^i \gg 1$, y $m_n^a \gg 1$, se obtienen tasas cinéticas que son funciones lineales de la concentración de los sustratos y la dinámica depende solamente del parámetro γ . En el límite opuesto, $K_{M,n}^{fos} \geq C_n^{tot}(x, t)$, y $K_{M,n}^{cin} \geq C_n^{tot}(x, t)$, las ecuaciones dinámicas dependerán de

los parámetros, γ , m_n^a y m_n^i . Para calcular las soluciones numéricas supondremos que el tamaño –en unidades adimensionalizadas– de la célula es de, $L = 100$, y que $\nu = 1$. Adicionalmente, en la región lejana a la saturación se pueden determinar los valores de γ para los que la señal se transmite, no obstante, en el límite de saturación solamente se pueden estimar las regiones en el espacio de tres parámetros, (γ, m_n^a, m_n^i) , para los cuales se transmite la señal a los diferentes niveles de la cascada.

3.1. Estados estacionarios

En este capítulo se presentan los resultados de las soluciones estacionarias del sistema de ecuaciones de reacción-difusión que representa el modelo de una cascada de transducción celular formada por seis ciclos. Debido a que el sistema de ecuaciones diferenciales es no-lineal se obtuvieron las soluciones numéricas usando la rutina “MOLCH” de la biblioteca “Math/Library” IMSL [10]. Los resultados sugieren que para tiempos suficientemente grandes los perfiles de concentración de las proteínas activadas alcanzan un estado estacionario, es decir, un perfil de concentraciones que es constante en el tiempo. Como se verá en el capítulo de la evolución temporal, las soluciones estacionarias son las de máximo alcance al interior y de mayor concentración activada, por lo que uno de los objetivos de esta tesis es analizar las condiciones necesarias bajo las cuales la señal se transmite de forma estacionaria al núcleo de la célula en la cascada de transducción.

Se realizarón las simulaciones para diferentes valores del parámetro γ en la región lejana a la saturación. Para los valores $\gamma < 1$, los resultados obtenidos sugieren que la señal se transmite a través de la cascada conforme transcurre el tiempo, has-

ta alcanzar un estado estacionario. En este caso la actividad de las cinasas es mayor que la actividad de las fosfatasas, lo que implica que las proteínas mensajeras de cada nivel se fosforilan más rápido de lo que tardan las fosfatasas en desactivarlas. Por otra parte, para valores $\gamma > 1$, ocurre lo contrario, es decir, la señal no se transmite a los últimos niveles de la cascada porque los perfiles de concentración decrecen exponencialmente y el alcance espacial al interior de la célula es muy corto. Esto se debe a que la actividad de las fosfatasas es mayor, por lo que un mensajero activado tiene más probabilidades de ser desactivado antes de poder transmitir el mensaje al ciclo siguiente.

En la gráfica (3.2) se muestra el comportamiento de los perfiles de concentración normalizada como funciones de la posición cuando, $\gamma = 0,1$, con la membrana localizada en el punto, $x = 0$, y el núcleo en, $x = 100$, para un tiempo, $t = 10,000$, (en unidades reducidas) suficientemente grande para que en cada simulación el sistema alcance el estado estacionario. Se observa que los perfiles de concentración de los dos últimos niveles alcanzan un valor constante de 0,9, formando una meseta en los puntos cercanos a la membrana. Se obtiene que el perfil de concentración de las proteínas activadas en cualquier nivel es mayor que el perfil de concentración del nivel inmediato anterior, para cada punto en el interior de la célula. Por lo tanto, a pesar de que la señal del primer nivel decae rápidamente como función de la posición al interior de la célula, la proteína en el último ciclo se mantiene activada alcanzando el núcleo. Este tipo de comportamiento del perfil de concentración se denominará "transducción favorable". Debido a que los perfiles de concentración estacionarios de las proteínas activadas varían como función de la posición se forman gradientes de concentración de proteínas en los diferentes niveles de la cascada.

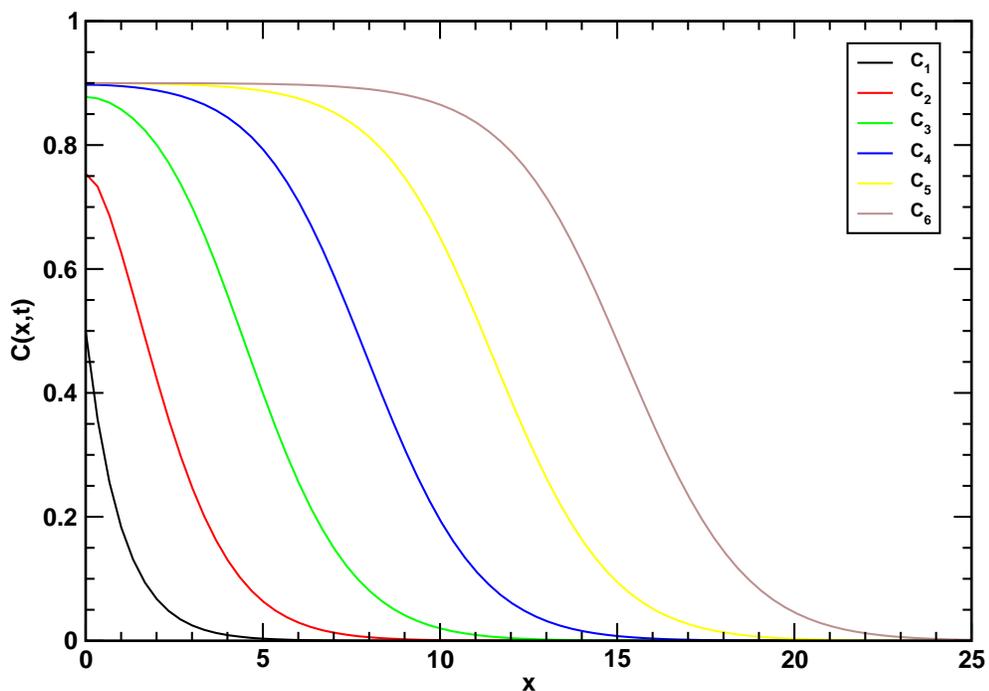


Figura 3.2: Perfiles de concentración normalizados para un valor del parámetro, $\gamma = 0,1$.

En la figura (3.3a) se muestra el comportamiento de los perfiles de concentración como función de la posición cuando $\gamma = 10$ para un tiempo, $t = 10,000$ en el que se obtiene un estado estacionario caracterizado por perfiles de concentración pequeños en cada uno los niveles. En el recuadro de la misma gráfica se observa que los perfiles decaen exponencialmente como función de la distancia al interior de la célula. Además, los perfiles de concentración activada de cada ciclo son menores a los perfiles de concentración de los niveles previos, de forma tal que los últimos niveles ni siquiera reciben la señal de forma significativa. Este comportamiento sugiere que el último mensajero no llega a su objetivo en el núcleo y a éste

escenario se le denominará de “transducción no favorable”.

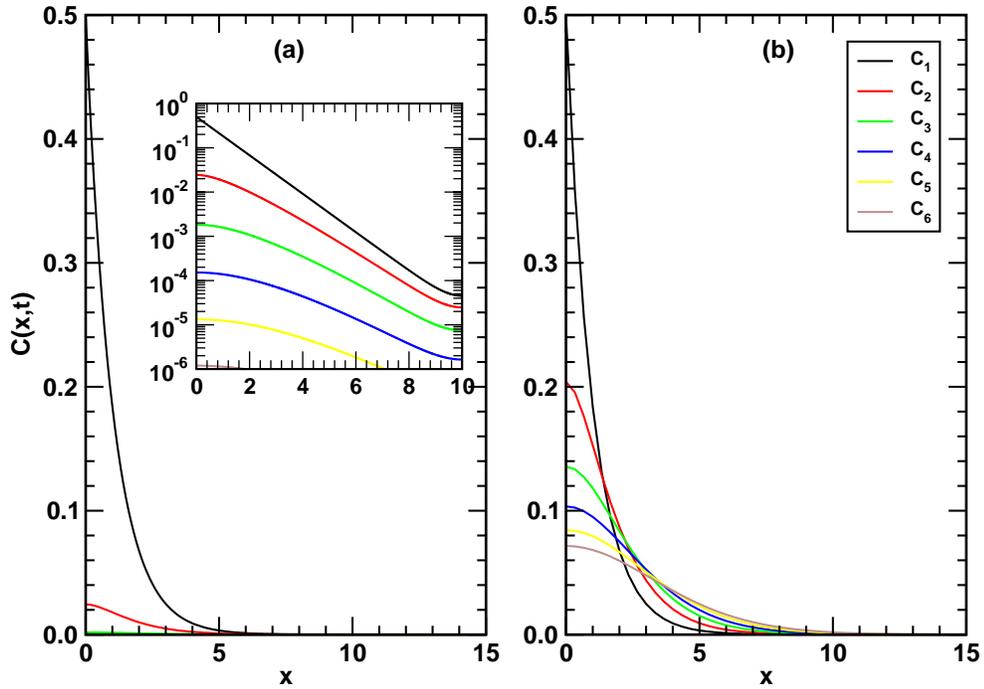


Figura 3.3: Perfiles de concentración para los parámetros cinéticos, m^a y m^i , en la región de valores menores a K_m : a) $\gamma = 10$, b) $\gamma = 1$.

En la figura (3.3b) se muestran los resultados de los perfiles de concentración como función de la posición en el caso en que la actividad química de las fosfatasas es igual al de las cinasas, es decir, $\gamma = 1$. Se encuentra que para posiciones cercanas a la membrana los perfiles de concentración activada decaen más lentamente que una exponencial y los niveles superiores tienen perfiles que son menores que los de los niveles inmediatos anteriores. No obstante, para posiciones más alejadas de la membrana los perfiles de concentración de los niveles superiores son mayores

que la de los inmediatos anteriores y tienen mayor alcance al interior de la célula, por lo que se identifica con un escenario de transducción favorable.

De los resultados anteriores, válidos para la región de valores lejanos a la saturación, se deduce que el parámetro γ divide el espacio de parámetros en tres dominios: (i) $\gamma < 1$, (ii) $\gamma = 1$ y (iii) $\gamma > 1$. La región (i) corresponde al caso en que la actividad de las fosfatasas es menor que la de las cinasa, y la señal se transmite, la región (iii) corresponde al caso opuesto, donde la señal no se transmite, mientras que la región (ii) corresponde al caso intermedio en el que las actividades de las cinasas y fosfatasas son iguales y separa las dos regiones anteriores.

En el regimen cinético, $m^i \leq 1$, y $m^a \leq 1$, las ecuaciones dinámicas son no-lineales y dependen de los tres parámetros relevantes, γ , m_n^a y m_n^i , cuyas diferentes combinaciones dan lugar a diferentes escenarios del proceso de señalización y contienen información más general de la cinética del sistema. En lo que sigue se analizarán en detalle los escenarios favorables de la cinética para la transducción de la señal.

Como ya se mencionó, para tiempos suficientemente largos se obtienen como soluciones de las ecuaciones no-lineales 3.9, soluciones estacionarias. De estos estados estacionarios se encuentran dos tipos de soluciones a saber: (i) Aquéllas donde los perfiles de concentración de las cinasas activadas de cualquier nivel son mayores que las correspondientes a los niveles inferiores y que en últimos niveles de la cascada alcanzan una meseta en una región del espacio cercana a la membrana de tal forma que la señal se transmite de manera robusta al interior de la célula, y (ii) aquéllas donde los perfiles de concentración decaen exponencialmente como función de la posición y la señal no se transmite. En las soluciones del tipo (i) los perfiles de concentración convergen a un valor de meseta máximo en los niveles

más altos de la cascada, es decir, la segunda derivada de la concentración respecto de la posición es cero, mientras que las soluciones del tipo (ii) se presentan principalmente en el primer nivel de la cascada con una distancia de decaimiento que depende del cociente entre la constante de difusión y de la constante cinética de la fosfatasa como se expresa en la ecuación 3.7.

Las soluciones que son de mayor interés biológico son las del tipo (i) y están definidas por la ecuación:

$$0 = -\frac{\gamma c(0)}{1 + \frac{c(0)}{m^i}} + \frac{(1 - c(0))c(0)}{1 + \frac{1-c(0)}{m^a}}. \quad (3.12)$$

Esta ecuación se obtiene de la segunda de las ecuaciones 3.9 considerando que la solución es estacionaria y que los últimos niveles de la cascada alcanzan un valor de meseta, $c_{n-1} \approx c_n = c(0)$ en posiciones cercanas a la membrana. La ecuación 3.12 esta escrita en términos de los tres parámetros cinéticos, (m^a, m^i, γ) y el valor de meseta, $c(0)$. El valor $c(0)$ se puede considerar como un parámetro ajustable en el intervalo, $0 \leq c(0) \leq 1$, y preferiblemente se elige su valor tal que sea mayor que el perfil de concentración de la primera cinasa en la membrana celular. Es importante recordar que el valor de este perfil de concentración depende del valor asignado a la intensidad de la señal externa, ν . En las soluciones que se analizan en esta tesis se usó, $\nu = 1$, lo que resulta en un perfil de concentración activada de la primer cinasa de, $c_1(x = 0) = 0,5$.

Para hacer una descripción integral de la cinética enzimática se escribe el parámetro m^a como una función del parámetro m^i para diferentes valores de γ . De esta forma se obtienen trayectorias en el plano (m^a, m^i) que se muestran en la figura (3.4). En esta figura se grafican trayectorias con cuatro colores diferentes para

los siguientes valores del parámetro, $\gamma = 0.05$ (rojo), 0.1 (azul), 1.0 (negro) y 10.0 (verde), para concentraciones, $c(0) = 0.9$ (líneas gruesas) y $c(0) = 0.95$ (líneas delgadas).

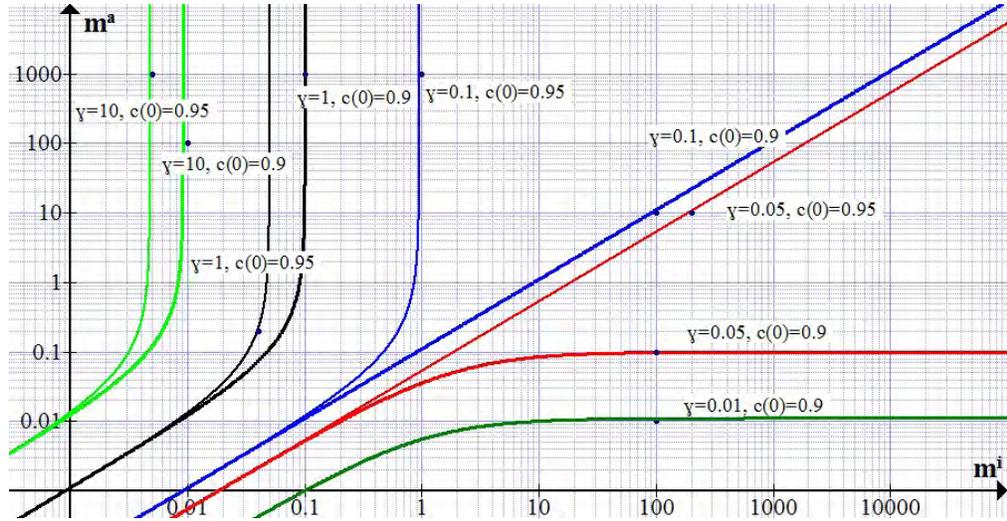


Figura 3.4: Gráfica de los parámetros m^a y m^i en escala logarítmica, para diferentes valores del parámetro γ .

En esta gráfica el plano se divide en cuatro cuadrantes o regiones como se muestra en la figura (3.5) y se numerarán en el sentido contrario del giro de las manecillas del reloj correspondiendo a valores cinéticos tales que, (i) $m^a > 1$ y $m^i > 1$; (ii) $m^a > 1$ y $m^i < 1$; (iii) $m^a < 1$ y $m^i < 1$; y (iv) $m^a < 1$ y $m^i > 1$.

El cuadrante (i) contiene la región de valores lejanos a la saturación analizada al principio de esta sección. Utilizando esta nueva clasificación podemos complementar los resultados obtenidos para concentraciones en la región de parámetros cinéticos, $m^a \gg 1$ y $m^i \gg 1$, donde la ecuación 3.12 se reduce a la siguiente relación,

$$\gamma = 1 - c(0), \tag{3.13}$$

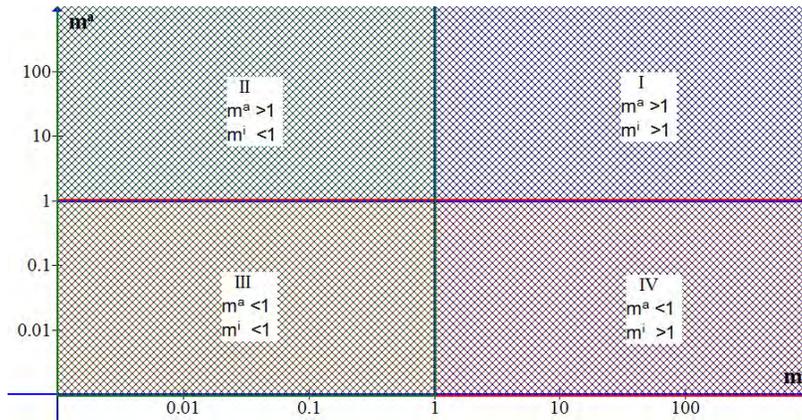


Figura 3.5: El espacio de parámetros m^i vs m^a dividido en cuatro regiones correspondientes a diferentes escenarios de transducción.

por lo que no es sorprendente ver en este cuadrante contenida la curva correspondiente al valor de, $\gamma = 0,1$, en donde la concentración alcanza un valor de meseta, $c(0) = 0,9$, como se mostró en los resultados de la gráfica (3.2). De la relación 3.13 se deduce que para $\gamma < 1$ se obtiene transducción de la señal en la región donde las concentraciones totales son mucho menores a las K_m de las cinasas y fosfatasas. Lo anterior se ve reflejado en la figura (3.6) donde se presentan los estados estacionarios de las concentraciones de los diferentes niveles de la cascada.

La gráfica (3.6a) corresponde al estado estacionario de una cascada de seis ciclos con valores de los parámetros ($\gamma = 0,1, m^a = 10, m^i = 100$), valores que están ubicados en la región (i). El valor de meseta del último ciclo es, $c(0) = 0,9$, lo que es consistente con el valor predicho por la ecuación 3.13. Por otra parte, la gráfica (3.6b) muestra los perfiles de concentración estacionarios para valores de los parámetros ($\gamma = 0,05, m^a = 10, m^i = 200$) con un valor de meseta $c(0) = 0,95$.

El cuadrante (ii) corresponde a la región de valores lejanos a la saturación para las cinasas pero de saturación para las fosfatasas. Análogamente al caso anterior,

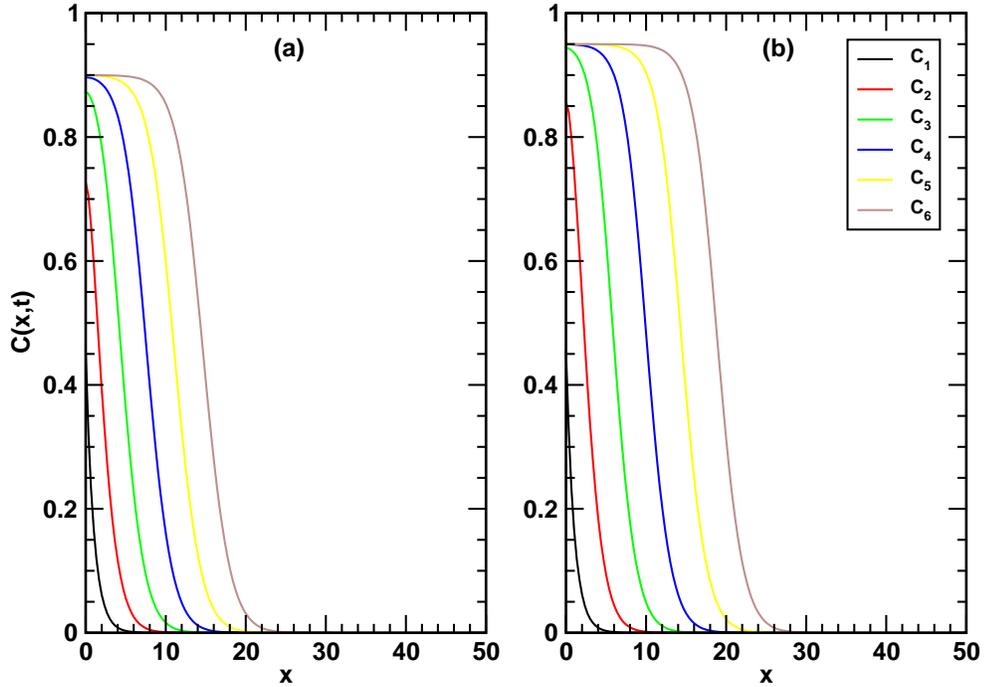


Figura 3.6: Perfiles de concentración del estado estacionario para valores de los parámetros cinéticos: a) $\gamma = 0,1$, $m^a = 10$, y $m^i = 100$, b) $\gamma = 0,05$, $m^a = 10$, y $m^i = 200$.

manipulando la ecuación 3.12 se obtiene la siguiente relación,

$$\gamma = (1 - c(0))\left(1 + \frac{c(0)}{m^i}\right), \quad (3.14)$$

donde se observa que existen dos subconjuntos de posibles soluciones, cuando $\gamma \leq 1$ y $\gamma \geq 1$. Utilizando esta ecuación y, considerando valores $c(0) > 0$, se obtiene:

$$\text{Si } \gamma \leq 1 \quad \text{entonces} \quad m^i \geq 1 - c(0)$$

$$\text{Si } \gamma \geq 1 \quad \text{entonces} \quad m^i \leq 1 - c(0) \quad (3.15)$$

Por lo tanto, se observa que cuando la actividad de las fosfatasas es más alta que la de las cinasas, $\gamma > 1$, la reacción de las fosfatasas debe de estar saturada para que se favorezca la propagación de la señal. Esto provee de una primera aproximación del comportamiento del sistema en la región de saturación de las cinasas.

En las gráficas (3.7a) y (3.7b) se muestran los perfiles de concentración de los estados estacionarios correspondientes a los valores, $(\gamma = 1, m^a = 1000, m^i = 0,1)$ y $(\gamma = 10, m^a = 100, m^i = 0,01)$, respectivamente.

El cuadrante (iv) corresponde a la región lejana a la saturación de las fosfatasas y de saturación de las cinasas. Reajustando los parámetros de la ecuación 3.12 para valores lejanos a la saturación de las fosfatasas, $m^i \gg 1$, obtenemos la siguiente relación.

$$\gamma = \frac{1 - c(0)}{1 - c(0) + m^a}. \quad (3.16)$$

Recordando que la condición para que exista transducción de la señal es que, $0 \leq 1 - c(0) \leq 1$, y que por definición $m^a > 0$, la ecuación anterior indica que, $\gamma < 1$. Esto indica que para valores de saturación de las cinasas la actividad de las mismas debe ser mayor que la actividad de las fosfatasas para que exista transducción favorable de la señal.

En la gráfica (3.8) se muestra el perfil de concentración en el estado estacionario obtenido para los valores $(\gamma = 0,05, m^a = 0,1, m^i = 100)$. En ésta se observa que los primeros seis ciclos no alcanzan el valor de meseta correspondiente, sin embargo, una cascada de doce niveles si alcanza el valor de $c(0) = 0,9$. Esto es debido a que

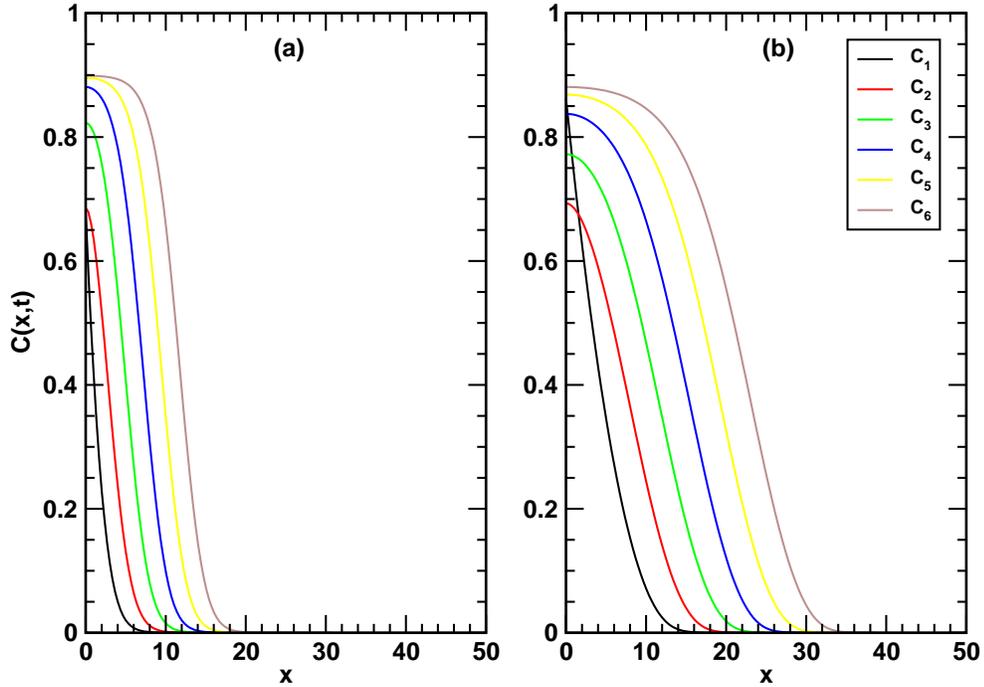


Figura 3.7: Perfiles de concentración del estado estacionario de los valores cinéticos: a) $\gamma = 1$, $m^a = 1000$, y $m^i = 0,1$, b) $\gamma = 10$, $m^a = 100$, y $m^i = 0,01$

en la ecuación 3.12 que relaciona a los tres parámetros cinéticos con $c(0)$, no esta en forma explícita el numero de ciclos necesarios para que exista la condición de meseta.

Por último, en el cuadrante (iii) se observa que están contenidas las curvas para todos los valores de γ y corresponde a una región de saturación tanto para las cinasas como para las fosfatasas. En esta región los valores de m^a y m^i son muy pequeños y la relación 3.12 se aproxima a la ecuación 3.17.

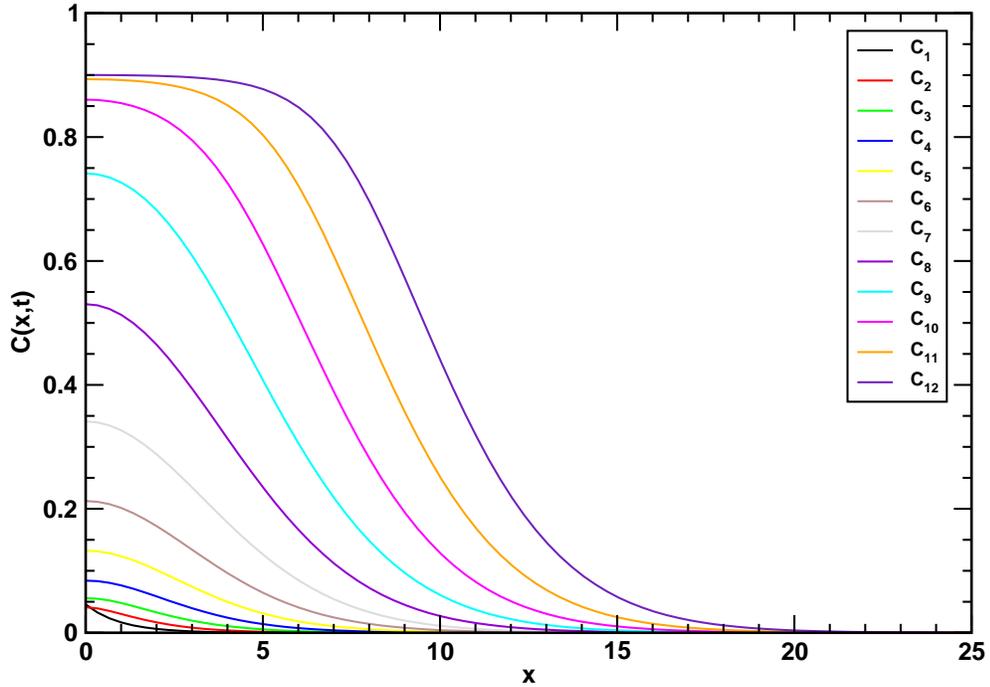


Figura 3.8: Perfiles de concentración del estado estacionario de una cascada de transducción compuesta de 12 ciclos con parámetros $\gamma = 0,05$, $m^a = 10$, $m^i = 200$.

$$m^a = \frac{\gamma}{c(0)} m^i \quad (3.17)$$

Esta es una aproximación inestable que afecta las condiciones de frontera y da como resultado soluciones al sistema de ecuaciones que no están determinadas de manera unívoca. Por lo tanto, los puntos en estas curvas en el espacio de parámetros corresponden a cascadas con transducción no favorable. Los resultados con valores de los parámetros localizados en este cuadrante muestran que no se alcanza la condición de transducción favorable ni la de meseta. Con la finalidad

de estudiar la robustez de los resultados obtenidos con la longitud –numero de ciclos– de la cascada se calcularón los perfiles de concentración estacionarios para cascadas con un mayor numero de ciclos y se obtuvieron los mismos resultados.

Una reacción enzimática que cumple con la ecuación de Michaelis-Menten esta determinada por las constantes cinéticas, $k_{M,n}^{cat}$ y $K_{M,n}$, para cada enzima. La velocidad máxima de reacción, V_{max} , es proporcional a la constante $k_{M,n}^{cat}$ y a la concentración total de la enzima. Por lo que el valor del parámetro γ , es proporcional a la concentración total de la enzima si se trata de una cinasa e inversamente proporcional si se trata de una fosfatasa. Por otro lado, los parámetros, m^a y m^i , son inversamente proporcionales a la concentración total del sustrato y se localizan por lo general en la región de valores lejanos a la saturación (región azul) [1], de acuerdo con la figura (3.1). Por otra parte se sabe que la concentración total de los sustratos en el interior de la célula está determinada por la expresión de los genes que los codifican. Además, todas las cascadas de señalización se encuentran interconectadas por lo que la sobre expresión o la inhibición genes pueden ser reguladas por señales procedentes de otras vías de transducción lo que da lugar a cambios en los valores de m^a y de m^i . Estos cambios en los parámetros cinéticos pueden inhibir o amplificar la señal dando lugar a cambios biológicos importantes en los organismos. Por lo anterior, es interesante extender el modelo básico que se ha estudiado en el presente capítulo con la finalidad de estudiar otros escenarios posibles que se presentan al interior de la célula. En el siguiente capítulo se adiciona al modelo básico un término que introduce regulación de la cinética enzimática y que se introduce en el modelo mediante términos de retroalimentación negativa.

Capítulo 4

Modelo de una vía de transducción celular con regulación.

Como ya se mencionó al final del capítulo anterior, además de los ciclos cinasa-fosfatasa hay también procesos de inhibición o regulación que ocurren cuando el producto final de una reacción interfiere con la enzima que contribuyó a producirlo. La inhibición se presenta cuando las enzimas tienen un segundo sitio activo –que difiere de aquel sitio en el que se unió el sustrato inicial– al cual se une el producto de la reacción para producir un cambio en la conformación (de la enzima) evitando así que se una al sustrato inicial. El propósito de los ciclos de inhibición es prevenir que el producto se genere en exceso. Así también, en rutas metabólicas contribuyen a equilibrar los procesos de síntesis o degradación de las moléculas que son fuentes de energía para la célula, por ejemplo, la glucosa, dependiendo de las necesidades del sistema.

La regulación mutua de dos componentes se considera como una retroalimentación que puede ser positiva, si contribuye a aumentar la concentración de alguna

de las componentes de la cascada, o bien, puede ser negativa si contribuye a disminuir dicha concentración. Usualmente en las células se observa regulación negativa tanto en sus vías metabólicas como en las cascadas de señalización multi-enzimáticas. Se sabe que en la vía de transducción MAP Cinasa (MAPK) existe regulación negativa de uno de los componentes tardíos en la cascada que contribuye en la desactivación del complejo formado con el receptor [8], [11]. La unión de esta cinasa con el complejo adaptador del receptor modifica su estructura mediante fosforilación desactivando éste último. Por lo general, la cinasa que regula al sistema en la cascada de señalización es la proteína MAPK. También se ha comprobado que esta cinasa contribuye a la atenuación de la actividad de la proteína Raf, una de las componentes tempranas de la cascada MAPK.

Recordando que en el capítulo anterior se analizó la dinámica de una cascada con seis ciclos básicos de fosforilación-defosforilación y se obtuvieron los escenarios favorables para la transducción de la señal, en este capítulo se analizarán los efectos de la adición de regulación inhibitoria para simular la vía de transducción MAPK. La cascada está formada por seis ciclos básicos de fosforilación-defosforilación y dos términos de regulación, uno en el primer ciclo y el otro en el tercer ciclo, que se introducen en el modelo en la forma de regulación negativa.

El sistema de ecuaciones diferenciales que define la dinámica de las concentraciones –normalizadas a la concentración total en cada ciclo–, del sistema de interés es:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = \gamma \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} - \gamma \frac{c_1}{1 + \frac{c_1}{m_1^i}} - \mu \frac{c_1 c_5}{1 + \frac{c_1}{m_1^r}} \quad (4.1)$$

$$\frac{\partial c_3}{\partial t} = \gamma \frac{\partial^2 c_3}{\partial x^2} - \gamma \frac{c_3}{1 + \frac{c_3}{m_3^i}} + \frac{(1 - c_3)c_2}{1 + \frac{1-c_3}{m_3^a}} - \mu \frac{c_3 c_5}{1 + \frac{c_3}{m_3^r}} \quad (4.2)$$

$$\frac{\partial c_n}{\partial t} = \gamma \frac{\partial^2 c_n}{\partial x^2} - \gamma \frac{c_n}{1 + \frac{c_n}{m_n^i}} + \frac{(1 - c_n)c_{n-1}}{1 + \frac{1-c_n}{m_n^a}} \quad (4.3)$$

donde en las ecuaciones correspondientes al primero y tercer ciclos se ha introducido una tasa de desactivación caracterizada por las constantes cinéticas, μ y m^r , que representan regulación negativa. La cinasa del quinto nivel, c_5 , es la enzima que cumple con la función de desactivar los receptores representados en el primer ciclo de la cascada y la cinasa c_3 , localizada en el citoplasma. Las ecuaciones se escribieron en forma adimensional y para ello se usaron la longitud y tiempo característicos del modelo sin regulación del capítulo anterior. El parámetro de regulación, $\mu = k^{reg}/k^{cin}$, representa la razón entre la actividad de la enzima reguladora y la actividad de la cinasa activadora del ciclo inmediato inferior.

Las condiciones de frontera que deben satisfacer las soluciones del sistema de ecuaciones corresponden a la ausencia de flujo tanto en la membrana, $x = 0$, como en el núcleo, $x = L$, para los ciclos posteriores al primero, es decir,

$$\frac{\partial c_1}{\partial x} \Big|_{x=0} = -\nu \frac{1 - c_1}{1 + \frac{1-c_1}{m_1^a}}, \quad \frac{\partial c_1}{\partial x} \Big|_{x=L} = 0 \quad (4.4)$$

$$\frac{\partial c_n}{\partial x} \Big|_{x=0} = 0, \quad \frac{\partial c_n}{\partial x} \Big|_{x=L} = 0 \quad (4.5)$$

Este modelo pretende complementar el que se propone en la referencia [7] y que se estudio en el capítulo anterior introduciendo los efectos de regulación en la dinámica de la cascada de transducción. Una posible interpretación del térmi-

no de retroalimentación en el primer ciclo es regular la cinasa que da inicio a la cascada y de filtrar el “ruido externo” producido por los diferentes ligandos que no están asociados a la vía de señalización pero que tienen una forma similar a los ligandos que son complementarios de los receptores. El término de regulación en el tercer ciclo atenúa el “ruido” producido por el cruzamiento de otras vías de señalización que no contribuyen explícitamente a la señal. Debido a que los términos de regulación negativa inhiben la producción de cinasas en el primero y tercer ciclos de la cascada, las trayectorias en el plano (m^a, m^i) para diferentes valores de γ del presente modelo están acotadas por las trayectorias correspondientes al modelo básico donde se encontró transducción. Se considerara que la cinética de las cinasas es idéntica, como en el caso sin retroalimentación, por lo que se tiene que, $m^r = m^a$

Recordando la definición del parámetro de regulación o retroalimentación μ , que regula los ciclos, 1 y 3, se puede reexpresar como,

$$\mu = k^{reg}/k_n^{cin} = k^{cat} C_5^{tot}/k_n^{cat} C_n^{tot}, \quad n = 1, \text{ y } 3. \quad (4.6)$$

Considerado que k^{cat} tiene el mismo valor en cada uno de los seis ciclos de la cascada, entonces, $\mu = C_5^{tot}/C_n^{tot}$, que representa una proporción entre las concentraciones totales de las cinasas reguladora y regulada. Por lo anterior, al variar el valor de C_5^{tot} y dejar fijas las concentraciones de los demás ciclos se varía automáticamente el valor del parámetro de regulación, μ . Cuando la concentración total de la cinasa, C_5^{tot} , es diferente a la concentración de las cinasas de los demás ciclos, —que se consideran todas iguales—, los parámetros cinéticos, μ , γ_6 , m_5^a y m_5^i , son diferentes entre ellos.

En el análisis se considerarán tres valores representativos del parámetro de regulación, μ , con diferentes valores, también representativos, de los parámetros cinéticos, a saber: (1) Cuando el parámetro de regulación, $\mu = 1$, que corresponde al caso en que las concentraciones totales, C_n , de todos los ciclos son iguales, y con valores de los parámetros cinéticos, $\gamma_6 = \gamma$, $m_5^g = m^a$ y $m_5^i = m^i$. (2) Cuando el parámetro de regulación, $\mu = 10$, que corresponde al caso en que la concentración total C_5 es diez veces más grande que las otras concentraciones –que se consideran iguales–, es decir, $C_5^{tot} = 10 \times C_1^{tot}$, con los siguientes parámetros cinéticos, $\gamma_6 = \gamma/10$, $m_5^g = m^a/10$ y $m_5^i = m^i/10$, y, (3) Cuando el parámetro de regulación, $\mu = 0,1$, que corresponde al caso en que la concentración total C_5 es una décima parte de las otras concentraciones $C_5^{tot} = C_1^{tot}/10$, con los siguientes parámetros cinéticos, $\gamma_6 = 10 \times \gamma$, $m_5^g = 10 \times m^a$ y $m_5^i = 10 \times m^i$.

A continuación, se analizará el comportamiento de los perfiles de concentración estacionarios cuando se tiene regulación negativa en el primero y tercer ciclo de la cascada en la región de parámetros, (m^a, m^i, m^r) correspondiente a la región de concentraciones lejanas a la saturación, $(m^a \gg 1, m^i \gg 1, m^r \gg 1)$. En este límite las soluciones de las ecuaciones dependen solamente de los parámetros, γ y μ , lo que da una primera aproximación al comportamiento de la cascada con regulación. Recordando que en el primer modelo se encontró que en este límite ocurre transducción cuando, $\gamma < 1$, el análisis del presente modelo se hará en este intervalo de valores de γ .

Por otra parte, en el régimen de concentraciones saturadas la dinámica depende de los tres parámetros cinéticos, m^a , m^i y m^r . En éste régimen se estudiarán los cuadrantes (ii) y (iv) de la figura (3.5), que corresponden a los escenarios: de saturación de las fosfatasas con valores lejanos a la saturación de las cinasas y, saturación

de las cinasas con valores lejanos a la saturación de las fosfatasas, respectivamente. Se omitirá el análisis del cuadrante (iii) $-(m^a < 1, m^i < 1)-$, porque en éste el sistema es inestable, es decir, las soluciones del sistema de ecuaciones diferenciales son inestables. También se realizará el análisis cuando los valores de los parámetros cinéticos son iguales a la unidad, $(m^a = 1, m^i = 1, m^r = 1)$, que define el punto de frontera entre los cuatro cuadrantes, como se muestran en la figura (3.5), y que además, representa valores cinéticos más reales, ya que se reporta que las concentraciones de las componentes de la cascada son, por lo general, cercanas al valor de K_m .

4.1. Estados estacionarios

En el modelo con regulación las ecuaciones que describen la dinámica del sistema son no-lineales aún en la región de concentraciones lejanas a la saturación por lo que se tienen que resolver las ecuaciones 4.3 numéricamente. Consideraremos que la intensidad de la señal en la membrana tiene el valor, $\nu = 1$, y que la longitud adimensionalizada de la célula es, $L = 100$, al igual que en el caso sin regulación, se expresarán los resultados en unidades de la distancia característica, α^{-1} , definida en la ecuación 3.7 y la escala de tiempo en unidades, $1/k^a$, definida por la actividad de la cinasa. Como en el modelo sin regulación aquí se omitirán los procesos de síntesis, secuestro y degradación de proteínas por lo que las concentraciones totales de las enzimas en cada ciclo se consideran constantes. La solución numérica de las ecuaciones se obtuvo hasta un tiempo, $t = 10,000$, que corresponde a un tiempo suficientemente largo para obtener perfiles de concentración estacionarios en el presente modelo.

En la región de valores lejanos a la saturación de ambas enzimas, ($m^a \gg 1, m^i \gg 1, m^r \gg 1$), y recordando que en el modelo sin regulación hay transducción de la señal cuando, $\gamma < 1$, aquí se calcularon las soluciones estacionarias de las ecuaciones para los siguientes valores de los parámetros cinéticos, ($\gamma = 0,1, m^a = 1000, m^i = 1000, m^r = 1000$). Los perfiles de concentración para cada uno de los niveles de la cascada se muestran en la figura (4.1a).

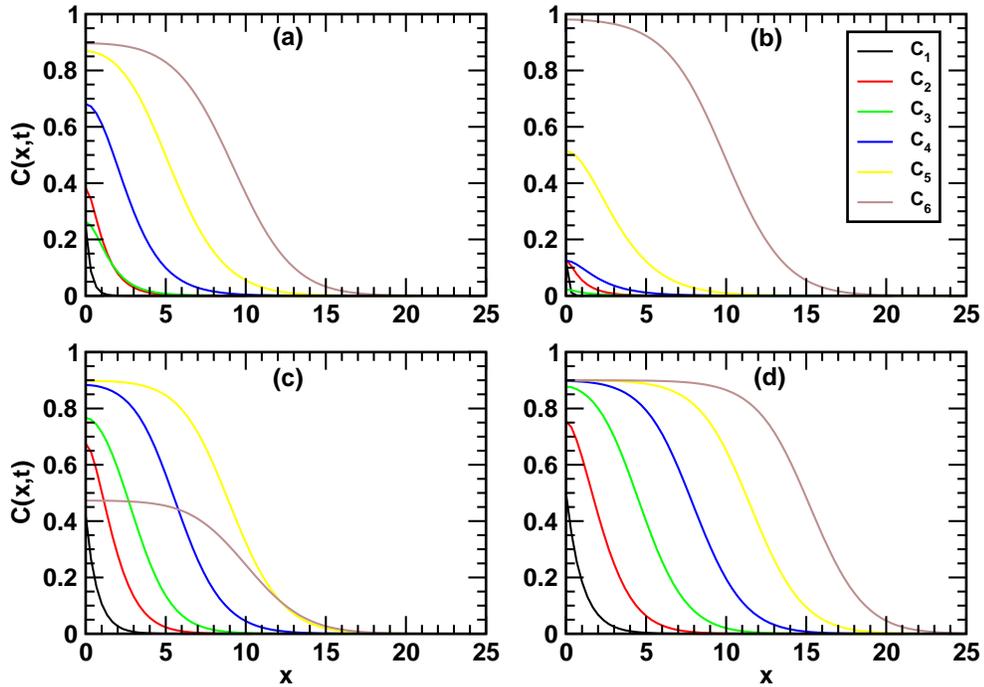


Figura 4.1: Perfiles de concentración estacionarios de una cascada con $\gamma = 0,1$ en la región de concentraciones lejanas a la saturación para diferentes valores del parámetro de regulación: a) $\mu = 1$, b) $\mu = 10$, c) $\mu = 0,1$ y d) $\mu = 0$ perfiles de concentración del modelo sin regulación .

Comparando los resultados de las gráficas (4.1a) y (4.1d) –modelo sin regula-

ción-, se observa que en el modelo con regulación las fracciones de concentración, c_1 y c_3 , son menores para cada uno de los puntos al interior de la célula. Esto se debe a los términos de regulación (retroalimentación negativa) que desactivan a las cinasas. También se observa que el alcance de la cascada al interior de la célula es menor cuando hay regulación negativa que cuando no la hay, no obstante, el valor de la concentración de meseta es el mismo, $c_6 = 0,9$, en ambos casos.

Se calcularon los perfiles de concentración estacionarios cuando, $\mu = 10$, que corresponde al escenario (2), con valores de los parámetros cinéticos, ($m^a = 1000, m^i = 1000, m^r = 1000$), y los resultados se muestran en la figura (4.1b). En esta gráfica se observa que las fracciones de concentración estacionarias de los primeros tres ciclos son menores al 10 % de proteína activada en todos los puntos al interior de la célula, no obstante, el ciclo c_6 , presenta un perfil de concentración con valores favorables –más del 50 %– que penetran al interior de la célula, similar al caso sin regulación.

En el escenario opuesto, caso (3), cuando, $\mu = 0,1$, se obtuvieron las soluciones numéricas de los perfiles de concentración estacionarios para los mismos valores de los parámetros cinéticos, ($m^a = 1000, m^i = 1000, m^r = 1000$), los cuales se muestran en la figura (4.1c). Se observa que debido a la baja concentración de la cinasa, C_5^{tot} , el efecto de la retroalimentación negativa es ínfimo en los primeros ciclos de la cascada y tiene un efecto importante en el perfil de concentración, c_6 , que resulta poco favorable para la transducción de la señal comparado con los resultados del modelo sin regulación, con un valor menor al 50 % en cada punto al interior de la célula y su longitud de penetración es menor que la correspondiente al perfil de concentración, c_5 .

En las regiones de saturación de una de las enzimas, cuadrantes (ii) y (iv), en

donde la concentración total de los sustratos es cercana a las constantes $K_{M,n}$, los parámetros m^a , m^i y m^r están presentes en las ecuaciones de la dinámica del sistema. Se omitirá el análisis del cuadrante (iii) debido a que las soluciones del modelo sin regulación son inestables. Así pues, se analizará la dinámica usando el valor representativo, $\gamma = 0,1$, para el que ocurre transducción de la señal en ambos cuadrantes.

Se iniciara el análisis en el punto frontera, ($m^a = 1, m^i = 1, m^r = 1$), de los cuadrantes descritos, comparando los resultados de ambos modelos para los mismos parámetros cinético. En este punto las concentraciones de las cinasas son iguales a la constante de Michaelis-Mente, K_M , y por general es una propiedad presente en la transducción de señales en las células [1].

La gráfica (4.2a) muestra los perfiles de concentración estacionarios de ambos modelos donde se observa que sí hay transducción de la señal. Se aprecia en el sistema con regulación que los perfiles de concentración de las cinasas de los tres primeros ciclos están fuertemente inhibidas debido a la acción reguladora de la quinta cinasa, no obstante, se observa que la sexta cinasa alcanza un porcentaje alto de proteína activada, 93 % cerca de la membrana y la penetración de la señal al interior de la célula decae más rápidamente cuando hay regulación.

En el escenario (2) el parámetro de retroalimentación tiene el valor, $\mu = 10$, y la concentración total de la quinta cinasa es 10 veces mayor que las otras concentraciones obteniendose los perfiles de concentración estacionarios que se muestran en la gráfica (4.2b).

En este caso los perfiles de concentración estacionarios correspondientes a los primeros ciclos de la cascada disminuyen drásticamente como función de la dis-

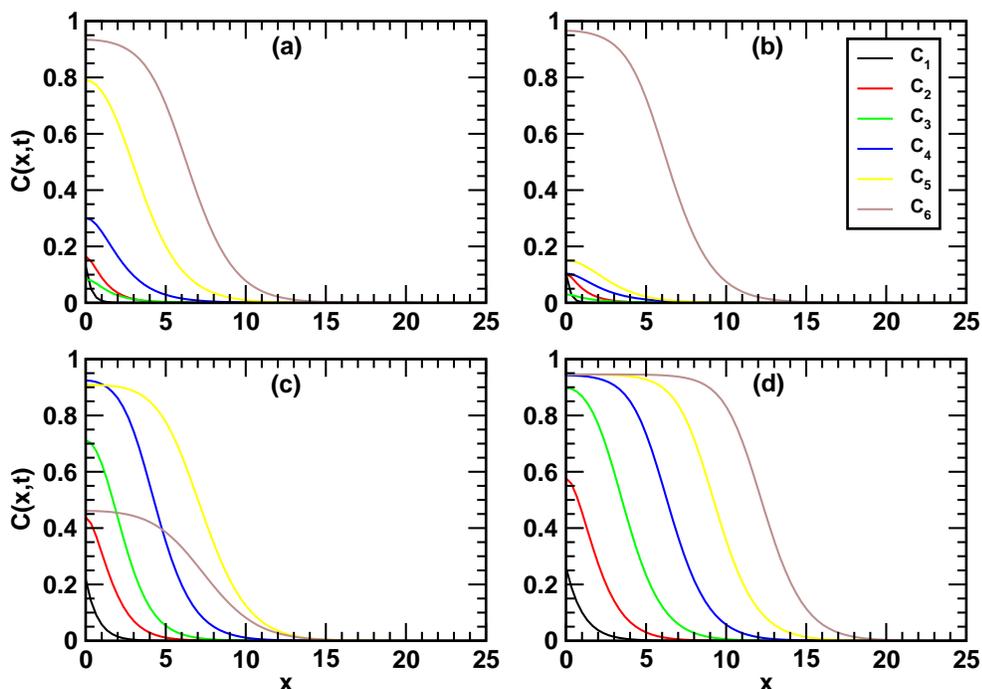


Figura 4.2: Perfiles de concentración estacionarios de una cascada con parámetros cinéticos $\gamma = 0,1$, $m^a = 1$, $m^i = 1$ para diferentes valores del parámetro de regulación: a) $\mu = 1$, b) $\mu = 10$, c) $\mu = 0,1$ y d) $\mu = 0$ perfiles de concentración del modelo sin regulación.

tancia al interior de la célula mientras que el último ciclo mantiene un perfil de concentración estacionario que es favorable, es decir, un alto porcentaje de activación cerca de la membrana y penetra al interior de la célula. La cinasa correspondiente al quinto ciclo muestra una concentración de la enzima activada menor al 20%, sin embargo, como su concentración total es 10 veces mayor esto significa que, comparada con el resto, alcanza un perfil favorable para la transducción. Debido a que los primeros niveles son fuertemente inhibidos por la cinasa c_5 , se sugiere que transcurrido cierto tiempo, después de la activación de los receptores,

los primeros niveles de la cascada no son importantes para la transducción de la señal.

En el escenario (3) el parámetro de retroalimentación tiene el valor, $\mu = 0,1$ y la concentración total de la cinasa del quinto ciclo es diez veces menor que las cinasas de los otros ciclos. Los perfiles de concentración estacionarios se muestran en la figura (4.2c). donde se observa que éstos difieren en varios aspectos al compararlos con los obtenidos en los escenarios (1) y (2).

Se encuentra que cuando hay regulación los primeros cinco niveles tienen perfiles de concentración similares a los obtenidos en el caso sin regulación al interior de la célula, lo que favorece la transducción de la señal. El perfil de concentración normalizada, c_5 , puede parecer engañoso debido a que, aunque muestra un perfil de concentración cercano a la unidad en la posición de la membrana, debe recordarse que su concentración total es diez veces menor a la de las demás, por lo que en comparación, transmite una señal débil y en consecuencia la concentración activada de la cinasa c_6 , es menor al 50 %, como se observa en la figura (4.2c).

Los resultados anteriores para el modelo con regulación muestran que en la región de concentraciones lejanas a la saturación de las reacciones los perfiles de concentración de los estados estacionarios de la cascada tienen una menor penetración que los correspondientes al modelo sin regulación, y por otra parte, el porcentaje de activación en cada punto al interior de la célula es menor cuando hay regulación. Cuando las concentraciones de las cinasas son iguales al valor K_M , $m^a = 1$ y $m^i = 1$, se obtienen resultados similares.

En lo que sigue se consideran los casos en los que una de las enzimas tiene una reacción saturada mientras que la otra tiene una reacción con concentraciones

lejanas a la saturación, casos que corresponden a los cuadrantes (ii) y (iv) de la figura (3.5). Se espera encontrar un consenso del parámetro μ para el que exista transducción favorable de la señal en el modelo de cascada con regulación negativa.

Primero se considera un escenario en donde se tienen concentraciones lejanas a la saturación de las cinasas, $m^a = 1000$, y saturación de las fosfatasas, $m^i = 0,5$, –punto que se localiza en el cuadrante (ii)– con un parámetro de retransalimentación, $\mu = 1$. Los perfiles de concentración estacionarios se muestran en la figura (4.3a) en los que se encuentra que se produce transducción de la señal. Además, se observa que los perfiles de concentración de las cinasas correspondientes al primer y tercer ciclos tienen porcentajes de activación que son menores que los restantes.

Por otra parte, cuando el parámetro de regulación tienen el valor, $\mu = 10$, con parámetros cinéticos, $m^a = 1000$, y $m^i = 0,5$, se obtuvieron los perfiles de concentración estacionarios que se muestran en la figura (4.3b). Los resultados sugieren que hay transducción de la señal y, como ocurre en la región de valores lejanos a la saturación, las cinasas de los cuatro primeros ciclos de la cascada tienen porcentajes de activación bajos en el interior de la célula, no obstante, la cinasa del sexto ciclo muestra un perfil de transducción de la señal favorable.

En el escenario (3) , cuando el parámetro de regulación tienen el valor, $\mu = 0,1$, con parámetros cinéticos, $m^a = 1000$, y $m^i = 0,5$, se obtuvieron los perfiles de concentración estacionarios que se muestran en la figura (4.3c). Como en los casos anteriores, nuevamente, se encuentra que la transducción de la señal es favorable, aunque el porcentaje de activación en el sexto ciclo es menor al 70 % debido a la baja concentración total de la quinta cinasa y tiene una baja penetración al interior de la célula que el caso sin regulación, figura (4.3d).

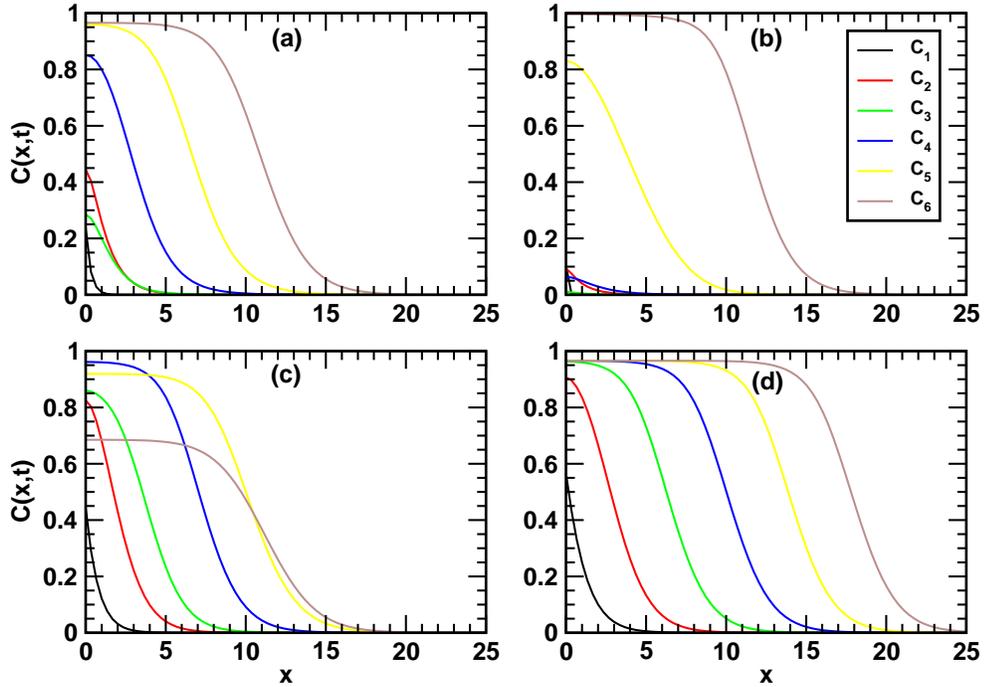


Figura 4.3: Perfiles de concentración estacionarios de una cascada con parámetros cinéticos $\gamma = 0,1$, $m^a = 1000$, $m^i = 0,5$ para diferentes valores del parámetro de regulación: a) $\mu = 1$, b) $\mu = 10$, c) $\mu = 0,1$ y d) $\mu = 0$ perfiles de concentración del modelo sin regulación.

En el escenario (1) cuando el parámetro de regulación tiene el valor $\mu = 1$, para el cuadrante (iv), se obtuvieron los resultados mostrados en la figura (4.4a), donde en los perfiles de concentración estacionarios se observa que existe transducción de la señal con las mismas propiedades que se obtuvieron para el cuadrante (ii), es decir, una concentración activada menor al 30% al interior de la célula para los dos primeros ciclos, pero un perfil del sexto ciclo comparable con los resultados del modelo sin regulación, figura(4.4d).

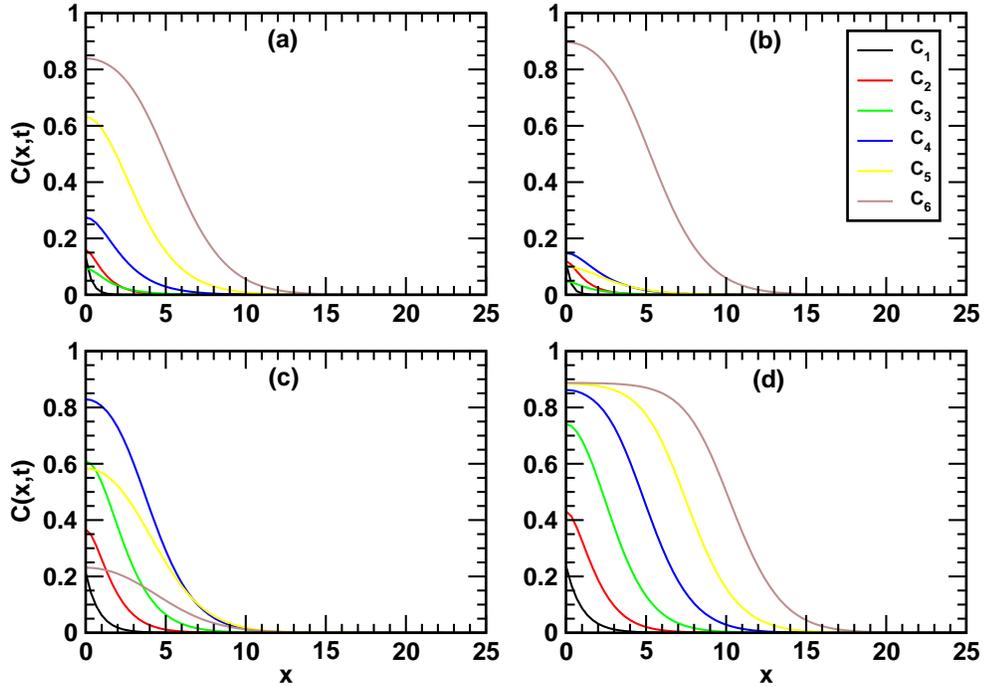


Figura 4.4: Perfiles de concentración estacionarios de una cascada con parámetros cinéticos $\gamma = 0,1$, $m^a = 0,9$, $m^i = 1000$ para diferentes valores del parámetro de regulación: a) $\mu = 1$, b) $\mu = 10$, c) $\mu = 0,1$ y d) $\mu = 0$ perfiles de concentración del modelo sin regulación.

En la figura (4.4b) se muestran los perfiles de concentración estacionarios cuando el parámetro de regulación es, $\mu = 10$ y $\gamma = 0,1$ correspondiente al escenario (2) con parámetros cinéticos, $m^a = 0,9$ y $m^i = 1000$ en el cuadrante (iv). Los resultados sugieren que hay transducción favorable de la señal con porcentajes de activación bajos para los primeros cuatro ciclos, no obstante, el sexto ciclo tiene un perfil de concentración con alto porcentaje de activación y una longitud de penetración al interior de la célula similar a los resultados obtenidos del modelo sin regulación.

En la figura (4.4c) se muestran los perfiles de concentración estacionarios cuando el parámetro de regulación es, $\mu = 0,1$ y $\gamma = 0,1$ correspondiente al escenario (3) con parámetros cinéticos, $m^a = 0,9$ y $m^i = 1000$ en el cuadrante (iv). La gráfica muestra perfiles de concentración con las mismas características observadas cuando se tienen parámetros cinéticos localizados en (ii), es decir, se observa transducción de la señal con un porcentaje de activación bajo para la cinasa correspondiente al último ciclo y una penetración al interior mas baja que los ciclos que le preceden.

De los resultados anteriores podemos concluir que en todos los casos la transducción de la señal es parcialmente favorable, es decir, cumple con la propiedad de ser un sistema de amplificación para la señal por la formación de gradientes de concentración, solo para algunos ciclos de la cascada dependiendo del parámetro de regulación. La diferencia significativa ocurre en el sexto ciclo. En el caso, $\mu = 0,1$, los resultados muestran que la transducción de la señal no es favorable por que no hay una amplificación de la señal recibida del quinto ciclo. Por otra parte, en los casos, $\mu = 1$ y $\mu = 10$, el perfil de concentración de la cinasa correspondiente al sexto ciclo es mayor y tiene una longitud de penetración al interior de la célula que es también mayor que los ciclos que le preceden. Además, los resultados sugieren que, en los casos, $\mu = 1$ y $\mu = 10$, el consumo de grupos fosfato se reduce de manera significativa debido a la inhibición de los primeros niveles que no impide la transducción favorable de la señal.

Es importante enfatizar que existe evidencia experimental de que la vía de señalización MAPK exhibe propiedades de regulación negativa. En particular se ha encontrado que, en la cascada compuesta por las proteínas Raf, MEK y ERK, la proporción entre sus concentraciones es 1:3:6 en las células COS y de 1:0.7:9 en los fibroblastos NIH 3T3 [12]. Estas proporciones corresponde al escenario (2) con

parámetro de regulación, $\mu = 10$, en los que C_5^{tot} es diez veces mayor a las demás. Lo anterior sugiere que los resultados obtenidos para este escenario, en relación al bajo consumo de grupos fosfato, son consistentes con lo que podría estar ocurriendo en la cascada MAPK *in vivo*.

En esta sección se estudió en detalle el comportamiento de las concentraciones estacionarias de las enzimas de los diferentes ciclos de la cascada como función de la posición en el interior de la célula. Los resultados muestran tres propiedades de los modelos de cascada con transducción favorable: (i) en cada nivel la señal se amplifica; (ii) la amplificación es debida a la formación de gradientes de concentración, aún en el sistema que esta regulado negativamente; y (iii) la cascada con parámetro de regulación, $\mu = 10$, muestra lo que podría ser un menor consumo de energía. En años recientes se han desarrollado diferentes técnicas de microscopía para medir la concentración de las proteínas activada como función de su posición al interior de la célula y se han comprobando las dos primeras propiedades en el estado estacionario [13].

Para completar el análisis de los modelos, en el siguiente capítulo se analizará la evolución temporal de la cascada sin regulación y con regulación, para tratar de entender las diferencias principales entre ambos modelos en la formación de los perfiles de concentración estacionarios para los escenarios de transducción favorable.

Capítulo 5

Evolución temporal de la vía de transducción.

Para entender la dinámica de la cascada antes del estado estacionario es importante e interesante analizar la evolución temporal de las concentraciones de proteínas activadas en cada ciclo de la cascada. Con la finalidad de simplificar el análisis, se define la concentración total activada de la proteína al tiempo t en el nivel n de la cascada al interior de la célula, $\tilde{c}_n(t)$, como la integral sobre todas las posiciones al interior de la célula de los perfiles de concentración reducida, $c_n(x, t)$, es decir:

$$\tilde{c}_n(t) = \int_0^L c_n(x, t) dx \quad (5.1)$$

En el caso de una vía de transducción no regulada se encontró que la concentración de proteína activada, $\tilde{c}_n(t)$, tiene un comportamiento monótono creciente en el tiempo hasta que las concentraciones alcanzan un comportamiento estacionario sugiriendo que, $c_n(x, t)$, alcanza sus valores máximos en el estado estacionario.

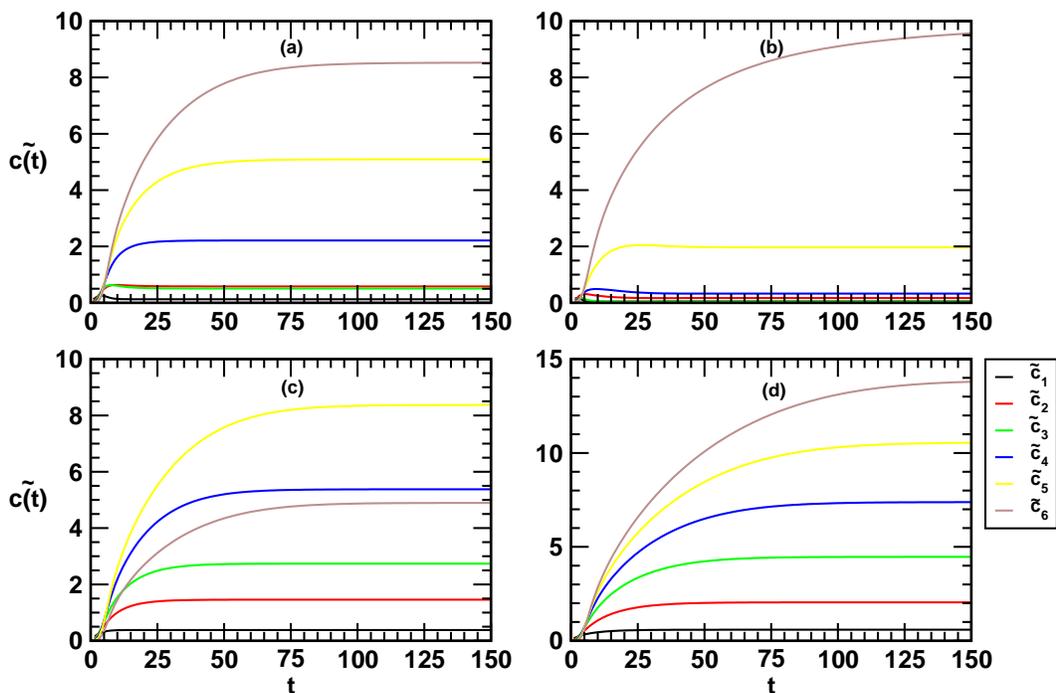


Figura 5.1: Evolución temporal de la concentraciones, $\tilde{c}_n(t)$, de cada uno de los ciclos de la cascada, $n = 1, 2, \dots, 6$, en la región de concentraciones lejanas a la saturación con, $\gamma = 0,1$, para diferentes valores del parámetro de regulación: a) $\mu = 1$, b) $\mu = 10$, c) $\mu = 0,1$ y d) $\mu = 0$ evolución temporal del modelo sin retroalimentación.

Por lo anterior, el análisis temporal en el caso sin regulación no es de mucha importancia, no obstante, con la finalidad de comparar los tiempos de respuesta con los correspondientes a la vía de transducción con regulación se analizarían los comportamientos de ambas cascadas como función del tiempo.

La figura (5.1a) muestra la evolución temporal de las concentraciones totales, $\tilde{c}_n(t)$, con $n = 1, 2, \dots, 6$, de cada uno de los ciclos de la cascada en la región de valores lejanos a la saturación tanto para las cinasas como para las fosfatasa, con

$\gamma = 0,1$, y $\mu = 1$, en un intervalo entre $0 \leq t \leq 200$, tiempo suficientemente largo para el sistema con regulación en el que las concentraciones totales activadas, $\tilde{c}_n(t)$, alcanzan un estado estacionario. Comparando ambas gráficas se observa que la concentración total activada en cada nivel de la cascada con regulación es una fracción de la intensidad de la señal –concentración total– que cuando no hay regulación, figura (5.1d). También se observa que en la cascada regulada el “estado transitorio” transcurre en un tiempo menor y que los ciclos que son regulados aumentan su fracción de activación al principio del proceso, no obstante, después de un cierto tiempo, $t \approx 5$, tal fracción disminuye. Es este intervalo en el que la señal de regulación es más intensa y produce la disminución de la fosforilación. Es decir, las concentraciones, $\tilde{c}_1(t)$ y $\tilde{c}_3(t)$ alcanzan su valor máximo en, $t \approx 5$ y después disminuyen debido a la regulación hasta un estado estacionario en equilibrio. Sin embargo, los otros niveles de la cascada aumentan monotónicamente hasta alcanzar su estado estacionario, aunque, el valor estacionario de los perfiles de concentración es 50 % menor que en el caso de la cascada sin regulación.

En la figura (5.1b) se muestra la evolución temporal de los perfiles de concentración total de cada uno de los ciclos de la cascada en la región lejana a la saturación con, $\gamma = 0,1$, para un valor del parámetro de regulación, $\mu = 10$. Se observa que los perfiles de concentración de los primeros tres ciclos son pequeños, menores que la unidad, mientras que el correspondiente al quinto alcanza su valor estacionario, $\tilde{c}_5(t) \approx 2$, a partir del tiempo, $t \approx 15$, sugiriendo la transmisión robusta de la señal. No obstante, el perfil de concentración del sexto ciclo aumenta monotónicamente en el intervalo de tiempo considerado y parece que alcanza su estado estacionario para tiempos mayores que 200 –similar al de la cascada sin regulación– con un porcentaje de concentración activada alto, aproximadamente cinco veces el valor

de la concentración del quinto ciclo. Esto sugiere que la alta concentración de la quinta cinasa compensa la inhibición de los primeros ciclos de la cascada. En la figura (5.1c) se muestran el caso, $\mu = 0,1$, en el que los perfiles de concentración total activada de los primeros tres ciclos son relativamente pequeños, $\tilde{c}_n \leq 3$, con, $n = 1, 2, 3$, similar al caso sin regulación negativa, esto se debe a que la concentración del quinto ciclo, \tilde{c}_5 , de la proteína activada es menor a las demás y su tasa de desactivación para las cinasas, c_1 y c_3 , es baja. Se observa que alcanzan su estado estacionario en un tiempo $t \approx 70$, más rápido que en el modelo sin regulación.

En lo que sigue se analizará la evolución temporal de la cascada no regulada y regulada cuando la concentración de los sustratos es igual a K_M . En la figura (5.2a) se muestran los perfiles de concentración total, $\tilde{c}_n(t)$ de la cascada con regulación, comparada con los perfiles del modelo sin regulación (5.2d), obtenidos con los siguientes valores de los parámetros cinéticos, ($m^a = 1, m^i = 1$), que corresponden al caso en el que las concentraciones de las cinasas son iguales al valor K_M . La concentración, $\tilde{c}_n(t)$, de la cascada sin retroalimentación muestra que la concentración activada en el nivel n , al interior de la célula, crece monóticamente hasta alcanzar el estado estacionario. Los primeros ciclos alcanzan el estado estacionario más rápido comparados con los últimos, en particular el sexto ciclo es el que tarda más, requiriendo del orden de $t \geq 200$ unidades de tiempo reducidas. En comparación, se observa que los niveles de la cascada con regulación alcanzan el estado estacionario en tiempos más cortos, los primeros ciclos requieren de aproximadamente, $t \geq 70$, mientras que el sexto ciclo requiere de $t \approx 130$ unidades de tiempo. Además se observa que los efectos de regulación, –decrecimiento de la concentración después del máximo y antes de alcanzar el estado estacionario–, en los primeros ciclos ocurren en tiempos del orden de, $t \leq 20$, mientras que en los

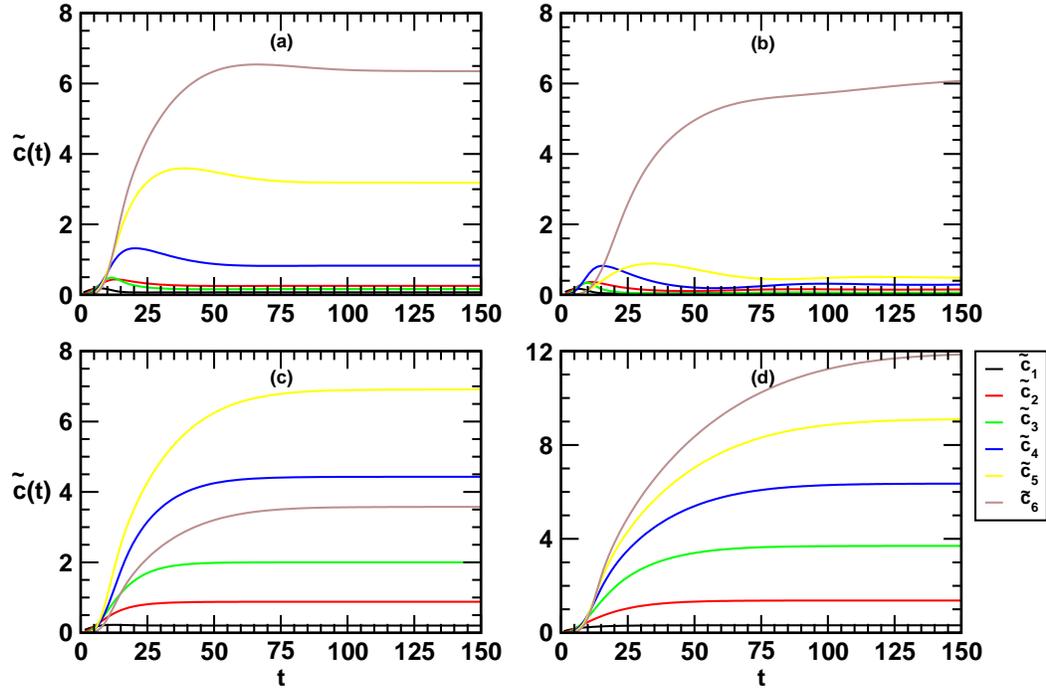


Figura 5.2: Evolución temporal de la concentraciones, $\tilde{c}_n(t)$, de cada uno de los ciclos de la cascada, $n = 1, 2, \dots, 6$, con parámetros cinéticos, $\gamma = 0,1$, $m^a = 1$, $m^i = 1$, para diferentes valores del parámetro de regulación: a) $\mu = 1$, b) $\mu = 10$, c) $\mu = 0,1$ y d) $\mu = 0$ evolución temporal del modelo sin retroalimentación.

dos últimos ciclos los efectos de la regulación se presentan para tiempos, $t > 30$.

Por otra parte, en la figura (5.2b) se muestran los perfiles de concentración, $\tilde{c}_n(t)$, en el caso en que el parámetro de regulación es, $\mu = 10$, que corresponde al caso en el que la concentración total de la quinta cinasa es diez veces mayor que las demás. Se observa que las concentraciones totales activadas de los cinco primeros ciclos al interior de la célula, $\tilde{c}_n(t)$, alcanzan un máximo después del cual decaen hasta alcanzar el estado estacionario de baja concentración. No obstante,

la concentración del sexto nivel, $\tilde{c}_6(t)$, aumenta rápidamente durante las primeras $t = 60$ unidades de tiempo para posteriormente mostrar un crecimiento lento y alcanzar su estado estacionario para tiempos $t \geq 200$ unidades.

La evolución temporal de las concentraciones, $\tilde{c}_n(t)$, cuando el parámetro de regulación tiene el valor, $\mu = 0,1$, que corresponde a la situación en que la concentración total de la quinta cinasa, C_5^{tot} , es diez veces menor que las demás, se muestran en la figura (5.2c). En esta gráfica se observa que la regulación no produce “estado transitorio” alguno con concentración activada mayor que el estado estacionario. Es decir, conforme transcurre el tiempo aumentan monótonicamente hasta alcanzar su valor estacionario favorable para la transducción, comportamiento análogo al caso de una cascada sin regulación. Este resultado sugiere que la regulación no tiene gran influencia debido a la baja concentración total de la cinasa del quinto ciclo comparada con el resto.

De los resultados anteriores se deduce que la evolución temporal de los perfiles de concentración total activada en cada uno de los niveles de la cascada sin regulación tienen valores más grandes que los correspondientes a la cascada con regulación, por otra parte el estado transitorio de la cascada con retroalimentación es menor al de la cascada sin regulación. Se observa que la evolución temporal del primer modelo, cascada sin regulación, es monótonicamente creciente para todos los escenarios de transducción favorable, alcanzando sus valores máximos en el estado estacionario. El análisis subsecuente se enfocara específicamente en el modelo con regulación, mostrando que esta regla del primero modelo no se cumple para la cascada con retroalimentación negativa.

En la gráfica (5.3a) se muestran los resultados de la evolución temporal de las concentraciones totales, $\tilde{c}_n(t)$, cuando $\gamma = 0,1$ y con valores de los parámetros

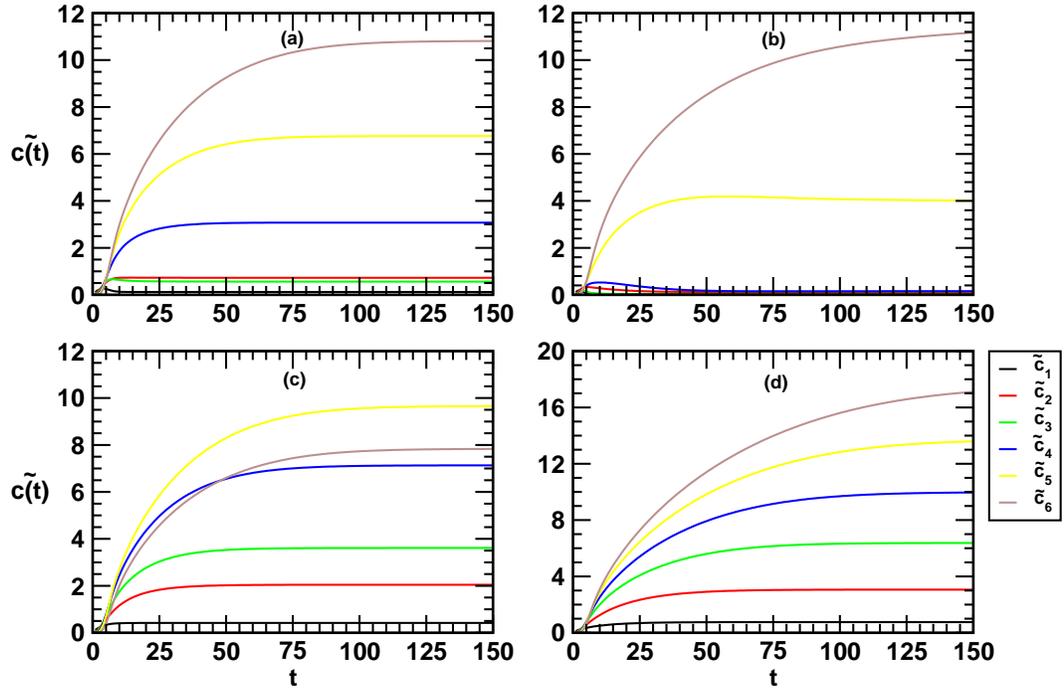


Figura 5.3: Evolución temporal de la concentraciones, $\tilde{c}_n(t)$, de cada uno de los ciclos de la cascada, $n = 1, 2, \dots, 6$, con parámetros cinéticos, $\gamma = 0,1$, $m^a = 1000$, $m^i = 0,5$, para diferentes valores del parámetro de regulación: a) $\mu = 1$, b) $\mu = 10$, c) $\mu = 0,1$ y d) $\mu = 0$ evolución temporal del modelo sin retroalimentación.

cinéticos, $m^a = 1000$ y $m^i = 0,5$, y parámetro de regulación, $\mu = 1$. Estos valores de los parámetros cinéticos se localizan en el cuadrante (ii) de la figura (3.5) y representan cascadas con concentraciones de las cinasas lejanas a la saturación y reacción saturada de las fosfatasas. La gráfica muestra la evolución temporal de la concentración total de las cinasas, $\tilde{c}_n(t)$, de los ciclos regulados. Se observa que para tiempos, $t \leq 30$, las concentraciones totales aumentan monóticamente hasta alcanzar su valor estacionario para $t > 30$.

En la gráfica (5.3b) se muestran los perfiles de concentración cuando el parámetro de regulación es, $\mu = 10$, para valores de los parámetros cinéticos localizados en el cuadrante (ii) de la figura (3.5) que corresponden a situaciones en las que las concentraciones de las cinasas tienen valores lejanos a la saturación y la reacción de las fosfatasas es saturadas. Se encuentra que la evolución temporal de las concentraciones totales de las cinasas de los cuatro primeros ciclos son pequeñas comparadas con las del quinto y sexto ciclo y su comportamiento es tal que aumentan en el transcurso del tiempo hasta alcanzar un máximo a tiempos relativamente cortos para después disminuir monótonicamente a un valor muy pequeño. El perfil de concentración de la cinasa del quinto ciclo presenta un comportamiento similar al anterior excepto que alcanza su valor máximo en un tiempo que es aproximadamente cinco veces más grande que el que tarda en ocurrir el máximo en los ciclos anteriores, para después alcanzar su estado estacionario. A diferencia de lo anterior, el comportamiento de la concentración de la cinasa correspondiente al sexto ciclo aumenta monótonicamente al transcurrir el tiempo alcanzando su valor máximo en el estado estacionario para tiempos muy largos, $t > 200$.

En la gráfica (5.3c) se muestra la evolución temporal de las concentraciones totales activadas, $\tilde{c}_n(t)$, con parámetros cinéticos, $\gamma = 0,1$, $m^a = 1000$ y $m^i = 0,5$, en el cuadrante (ii) y con parámetro de regulación, $\mu = 0,1$. Se observa que en los primeros cuatro ciclos las concentraciones de las cinasas aumentan y los efectos de la regulación son casi imperceptibles. La concentración de la cinasa correspondiente al quinto ciclo aumenta monótonicamente y es mayor que las concentraciones de las cinasas de los otros ciclos, sin embargo, éste resultado es aparente ya que su concentración total es diez veces menor a las demás y por lo tanto, su porcentaje de activación es mucho mayor. El sexto ciclo alcanza el estado estacionario en un

tiempo mayor que los ciclos que le preceden.

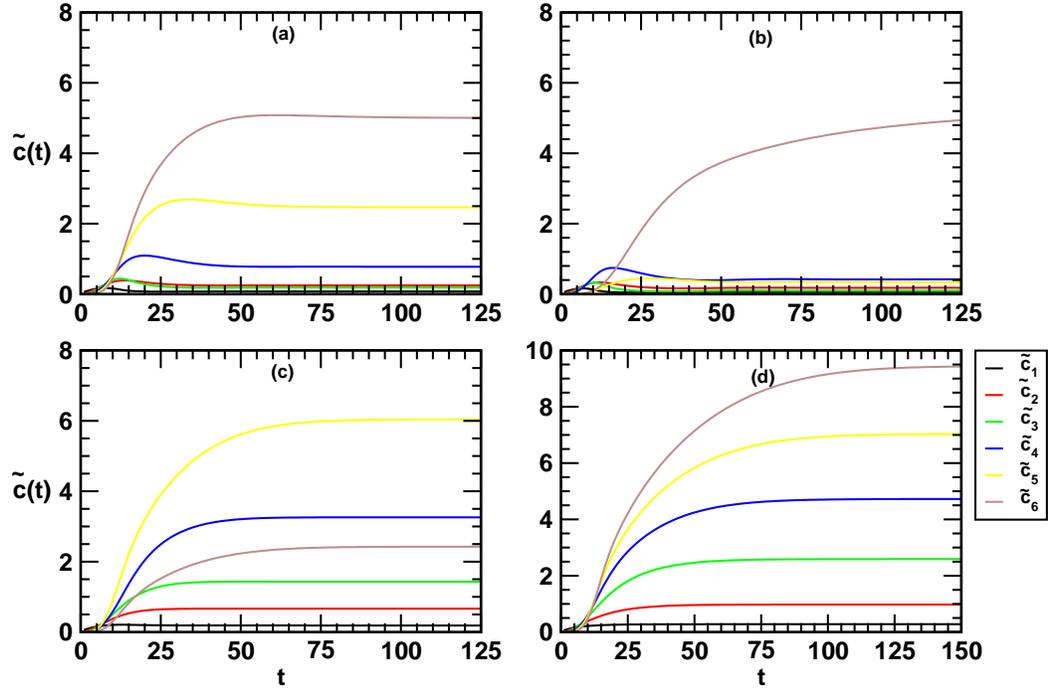


Figura 5.4: Evolución temporal de la concentraciones, $\tilde{c}_n(t)$, de cada uno de los ciclos de la cascada, $n = 1, 2, \dots, 6$, con parámetros cinéticos, $\gamma = 0,1$, $m^a = 0,9$, $m^i = 1000$, para diferentes valores del parámetro de regulación: a) $\mu = 1$, b) $\mu = 10$, c) $\mu = 0,1$ y d) $\mu = 0$ evolución temporal del modelo sin retroalimentación.

La evolución temporal de los perfiles de concentración totales de cada ciclo en la gráfica (5.4a) son para valores de los parámetros cinéticos, $m^a = 0,9$ y $m^i = 1000$, localizados en el cuadrante (iv), con $\gamma = 0,1$, y parámetro de regulación $\mu = 1$. Estos valores representan escenarios en los que las cinasas están saturadas y las fosfatasa tienen valores de ración lejanos de la saturación. Se observa que los valores de $\tilde{c}_n(t)$ de los primeros cinco ciclos aumentan al transcurrir el tiempo hasta

alcanzar un máximo a tiempos relativamente cortos en el intervalo, $10 \leq t < 30$. Para tiempos mayores los primeros tres decaen a un valor pequeño cercano a cero, mientras que los ciclos cuatro y cinco disminuyen ligeramente hasta alcanzar su estado estacionario para tiempos mayores que $t = 40$. A diferencia de los otros ciclos, la concentración del sexto ciclo aumenta monótonicamente y alcanza el estado estacionario, $\tilde{c}_6 \approx 5$, para tiempos, $t > 50$.

Por otra parte, en la figura (5.4b) se muestra el comportamiento de los perfiles de concentración para un valor del parámetro de regulación, $\mu = 10$ y con los mismos parámetros cinéticos, $\gamma = 0,1$, $m^a = 0,9$ y $m^i = 1000$. Se observa que las concentraciones de las cinasas de los primeros cinco ciclos se inhiben rápidamente, alcanzan su valor máximo, $\tilde{c}_n \lesssim 1$, ($n = 1, 2, 3, 4, 5$) para tiempos $t < 15$ y después decrecen en forma importante hasta alcanzar su estado estacionario. A diferencia de este comportamiento, la concentración de la cinasa del ciclo seis crece monótonicamente alcanzando su estado estacionario, $\tilde{c}_6 \approx 6$ para $t > 200$. Este resultado es similar al que se obtuvo anteriormente para valores análogos de los parámetros cinéticos, m^a y m^i .

Finalmente, cuando el parámetro de regulación es pequeño, $\mu = 0,1$, y los parámetros cinéticos son los mismos que en los casos anteriores, $m^a = 0,9$ y $m^i = 1000$, –en el cuadrante (iv)–, y $\gamma = 0,1$, se obtuvieron los resultados que se muestran en la gráfica (5.4c). Se observa que las concentraciones de las cinasas de los seis ciclos aumentan monótonicamente hasta alcanzar un estado estacionario casi sin poder percibirse los efectos de los terminos de regulación. Como en ningún se presenta un máximo diferente del estado estacionario, el caso del parámetro, $\mu = 0,1$ es cercano al caso sin regulación, excepto en el sexto ciclo para el cual su concentración total activada está reducida debido a la baja concentración de la

quinta cinasa. Por lo que esta regulación en particular afecta la transducción en el último ciclo.

El análisis de la evolución temporal de las concentraciones totales activadas, $\tilde{c}_n(t)$, sugiere que, en el caso sin regulación, los perfiles de concentración en el estado estacionario representan valores máximos para la cascada, mientras que en el caso con regulación se puede presentar un valor máximo antes del estado estacionario a diferentes tiempo para los primeros ciclos de la cascada. Además, se observa que el estado transitorio es de corta duración principalmente para los primero cinco ciclos de la cascada. Particularmente, los resultados correspondientes a los casos de regulación (1), $\mu = 1$, y (2), $\mu = 10$, muestran que a pesar de un bajo porcentaje de activación de cinasas en los primeros ciclos hay una propagación favorable de la señal en los últimos ciclos de la cascada lo que sugiere que el consumo de energía es menor que en la cascada sin regulación.

Capítulo 6

Conclusiones

Del modelo sin retroalimentación se obtiene una relación de los parámetros, γ , m^a , m^i y de la concentración denominada de meseta para los últimos niveles de la cascada. Ésta determina perfiles de concentración de transducción favorable, vistos en el estado estacionario, $t = 10,000$, en las diferentes regiones de concentración respecto al valor K_m para ambas enzimas. Únicamente, esta relación no es válida en la región (III) donde la aproximación de los parámetros da una ecuación inestable que tiene como resultado soluciones a las ecuaciones diferenciales que no están determinadas de manera unívoca.

Al incluir al modelo los términos de regulación negativa, en general, se obtienen resultados identificados con transducción favorable de la señal para las mismas regiones de concentración en las que el primer modelo presenta esta cualidad. Se deducen de las ecuaciones tres tipos de regulación asociados al valor del parámetro, μ , a saber: (i) $\mu = 1$, (ii) $\mu > 1$ y (iii) $\mu < 1$. De los tres escenarios de regulación, analizados para las diferentes regiones de concentración, en el caso, $\mu = 1$, se observa una disminución de las concentraciones activadas, c_1 y c_5 , con un alcance, al interior de la célula, similar al de la cascada sin regulación; el caso,

$\mu = 10$, muestra una disminución significativa de las concentraciones activadas, c_n , de todas las proteínas en la cascada, excepto en el sexto ciclo, el cual tiene un perfil de transducción favorable en su penetración hacia el núcleo en todas las regiones de transducción del modelo inicial; finalmente, en el caso, $\mu = 0,1$, se ven perfiles similares al caso sin regulación, $\mu = 0$, para los primeros cinco ciclos, sin embargo, la concentración activada del sexto nivel muestra un perfil poco favorable para la transmisión de la señal a su objetivo en el núcleo.

La información experimental de la vía de señalización MAPK con regulación muestra que las proteínas Raf:MEK:ERK tienen una proporción entre sus concentraciones de 1:3:6 en células COS y de 1:0.7:9 en los fibroblastos NIH 3T3 [12]. Esta proporción es similar al modelo con un parámetro $\mu = 10$, el cual sugiere una transducción favorable de la señal con un consumo menor de energía que la cascada sin regulación.

El análisis de la evolución temporal del modelo sin retroalimentación muestra que el estado transitorio es de corta duración y en él se desarrolla un crecimiento monotonico de las concentraciones activadas hasta alcanzar el estado estacionario, el cual es de valor máximo y por lo tanto, de mayor alcance al interior de la célula. De la evolución temporal del modelo con retroalimentación se deduce que las concentraciones totales activadas al interior de la célula pueden alcanzar un valor máximo, durante el estado transitorio, que es mayor al estado estacionario, esto es debido a la influencia de los terminos de retroalimentación que a cierto tiempo se vuelven más intensos, aniquilando la señal de los ciclo regulados. Estos valores maximos en el estado transitorio podrian ser importantes para el incremento acelerado de la señal en los ultimos ciclos, la cual, pasado ese tiempo, puede sostenerse en el estado estacionario.

Bibliografía

- [1] Nelson, D. L., M. M. Cox. 2008. *Lehninger's Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, Quinta edición, E.U.A.
- [2] Marks F., U. Klingmuller, K. Muller-Decker. 2009. *Cellular Signal Processing*. Garland Science, E.U.A.
- [3] Berridge J. M. 2012. *Cell Signalling Biology*. doi:10.1042/csb0001001
- [4] Lodish H., A. Berk, P. Matsudaira, C. A. Kaiser, M. Krieger, M. P. Scott, L. Zipursky, J. Darnell. 2012. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, Quinta edición, E.U.A.
- [5] Stadtman ER, Chock PB. 1977. *Superiority of Interconvertible Enzyme Cascades in Metabolic Regulation: Analysis of Monocyclic Systems*. Proc Natl Acad Sci 74. pp 2761-2765.
- [6] Goldbeter A, Koshland DE. 1981. *An Amplified Sensitivity Arising from Covalent Modification in Biological Systems*. Proc Natl Acad Sci 78. pp 6840-6844.
- [7] Muñoz-García J., Z. Neufeld, B. N. Kholodenko. 2009. *Positional Information Generated by Spatially Distributed Signaling Cascades*. PLoS Computational Biology, Volumen 5, Número 3.

- [8] Anderson N. G., L. A. Marsden, N. Williams, T. M. Roberts, T. W. Sturgill. 1991. *Raf-1 is a potential substrate for mitogen-activated protein kinase in vivo*. Biochem. J., Número 277, p.p. 573-576.
- [9] Taylor M. E. 1997. *Partial Differential Equations III. Nolinear Equations*. Applied Mathematical Science 117, Springer, E. U. A.
- [10] IMSL Fortran Subroutines for Mathematical Applications, pp. 717
- [11] Brunet A., G. Pagés, J. Pouyssegur. 1994. *Growth factor-stimulated MAP kinase induces rapid retrophosphorylation and inhibition of MAP kinase kinase (MEK1)*. FEBS Letters, Número 346, p.p. 299-303.
- [12] Sturm O. E., R. Orton, J. Grindlay, M. Birtwistle, V. Vyshemirsky, D. Gilbert, M. Calder, A. Pitt, B. Kholodenko, W. Kolch. 2010. *The Mammalian MAPK/ERK Pathway Exhibits Properties of a Negative Feedback Amplifier*. PLoS Computational Biology, Volumen 3, Número 153.
- [13] Dehmelt L., P. I. H. Bastiaens. 2010. *Spatial organization of intracellular communication: insights from imaging*. Nature reviews, Volumen 11, pp. 440-452.
- [14] Marcelo B., D. Barken, S. L. Werner, A. Hoffmann. 2013. *The Dynamics of Signaling as a Pharmacological Target*. Cell, Volumen 155, p.p. 448-461.
- [15] Murphy L. O., J. Blenis. 2006. *MAPK signal specificity: the right place at the right time*. TRENDS in Biochemical Sciences, Volumen 31, Número 5.
- [16] Kolch W., M. Calder, D. Gilbert. 2005. *When kinases meet mathematics: the systems biology of MAPK signaling*. FEBS Letters, Número 579, p.p. 1891-1895.
- [17] P. Doupé, D., N. Perrimon. 2014. *Visualizing and Manipulating Temporal Signaling Dynamics with Fluorescence-Based Tools*. Science Signaling, Vol 7, Issue 319.

- [18] Kholodenko, B. N. 2006. *Cell-signalling dynamics in time and space*. Nature Reviews, Volumen 7, p.p. 165-178.
- [19] Kholodenko, B. N., G. C. Brown, J. B. Hoek. 2000. *Diffusion control of protein phosphorylation in signal transduction pathway*. Biochem. J., Número 350, p.p. 901-907.
- [20] Douville, E., J. Downward. 1997. *EGF induced SOS phosphorylation in PC12 cells involves P90 RSK-2*. Oncogene, Número 15, p.p. 373-383.

Apéndice I

Solución estacionaria del primer ciclo.

Las ecuaciones diferenciales parciales que conforman el modelo de cascada de seis ciclos, con la cinética de Michaelis-Menten, son no lineales. Sin embargo, en el estado estacionario, la primera ecuación puede resolverse analíticamente en la región de concentraciones de los sustratos lejanas a la saturación. El problema se reduce a una ecuación de segundo orden con condiciones de frontera de tipo Neumann y se reescribe en la ecuación 6.1 como:

$$0 = D \frac{d^2 c_1}{dx^2} - k_1^i c_1 \quad (6.1)$$

$$\begin{aligned} D \frac{\partial c_1}{\partial x} \Big|_{x=0} &= -k_1^a (1 - c_1) \\ D \frac{\partial c_1}{\partial x} \Big|_{x=L} &= 0 \end{aligned}$$

La solución a la ecuación 6.1 resulta de la suma de dos exponenciales de la forma:

$$c_1(x) = Ae^{\alpha x} + Be^{-\alpha x} \quad (6.2)$$

Donde el valor parámetro α –que tiene unidades de longitud inversa– se obtiene al sustituir la solución 6.2 en la ecuación diferencial 6.1. La longitud característica α^{-1} que depende del cociente entre el coeficiente de difusión, D , y la constante cinética, k^i , representa la distancia a la cual la contribución de la exponencial es $1/e$, con $e = 2,71828183$.

Así pues, la longitud característica α^{-1} se expresa como,

$$\frac{1}{\alpha} = \sqrt{\frac{D}{k^i}} \quad (6.3)$$

Aplicando a la condición de frontera en el punto $x = L$, se obtiene la siguiente relación entre los coeficientes A y B .

$$B = Ae^{2\alpha L} \quad (6.4)$$

Evaluando en la frontera $x = 0$, que corresponde al punto en la membrana, se obtiene el valor algebraico del coeficiente A ,

$$A = \left(\frac{k^a}{k^a - D\alpha}\right) \frac{1}{1 + \eta e^{2L}} \quad (6.5)$$

donde η se expresa como:

$$\eta = \frac{k^a + D\alpha}{k^a - D\alpha}$$

Por lo tanto, la solución analítica a la ecuación diferencial es,

$$c_1(x) = \left(\frac{k^a}{k^a - D\alpha}\right) \frac{e^{\alpha x} + e^{2L} e^{-\alpha x}}{1 + \eta e^{2L}} \quad (6.6)$$