

Pràctica 9

Transmissió de senyal

Transmissió de senyal.

Introducció

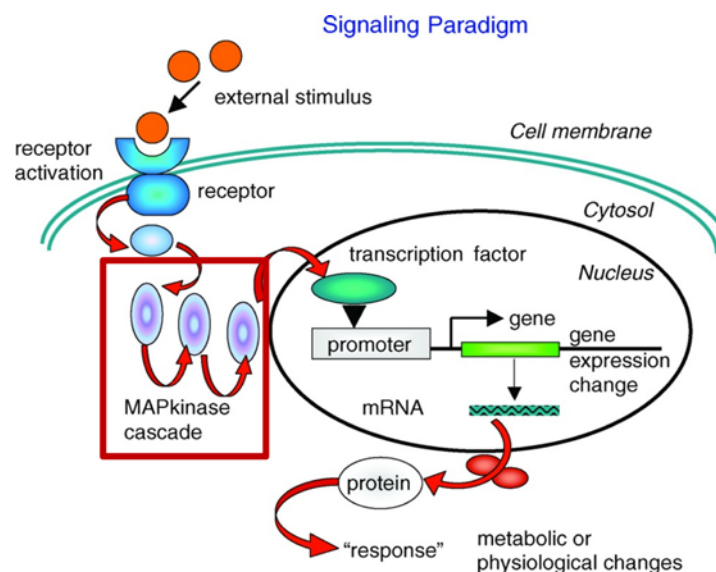
Les cèl·lules disposen de una variada gama de mecanismes per establir comunicació amb el seu entorn i poder donar-hi resposta. De manera genèrica anomenem senyal extracel·lular a aquells factors als que la cèl·lula és sensible (concentracions de substàncies, hormones, feromones, calor, fred, llum,...), generalment a través de receptors específics. A través dels receptors els senyals externs es transformen en senyals interns encadenats per seqüències de reaccions.

A nivell molecular la transmissió del senyal intracel·lular té lloc a través del mateix tipus de processos que a les xarxes metabòliques (producció i degradació d'intermediaris, modificacions de molècules tals com la fosforilació o l'acetilació). Tot i així presenten característiques importants que les fan significativament diferents de les xarxes metabòliques sobretot a nivell del comportament i per tant la modelització.

Les xarxes de transmissió del senyal estan altament adaptades al processament i transmissió de senyals. A diferència de les xarxes metabòliques, que venen determinades per la presència o absència d'enzims que catalitzen les reaccions, les xarxes de senyal fins i tot es poden autoorganitzar en el moment d'aparició del senyal, mentre que d'altres poden tenir els seus components associats a un entramat (scaffold) que les manté localitzades a una zona..

Si les comparem a les xarxes metabòliques on hi intervenen i s'interconverteixen grans quantitats de material (concentracions de l'ordre de μM o mM i temps característics de minuts) veiem que a les xarxes de senyal el nombre de molècules implicades és baix (de l'ordre de 10 a 10000 molècules per cèl·lula i els temps característics son habitualment menors).

A les xarxes metabòliques la relació entre el catalitzador (enzim) i el substrat és habitualment baixa (baixa concentració d'enzim en relació a la concentració de substrats i productes) el que permet fer servir cinètiques de tipus Michaelis-Menten (derivades a partir de mecanismes que es troben en un estat pseudoestacionari respecte als nivells del complex enzim-substrat). A les xarxes de senyal els nivells de catalitzadors i els seus substrats són del mateix ordre de magnitud raó per la qual, en molts casos (no es té en compte aquí), no es poden fer servir cinètiques Micaelianes si es vol obtenir una dinàmica del sistema correcta.



© 2010 Wiley-VCH, Weinheim
 Klipp - Systems Biology
 ISBN: 978-3-527-31874-2 fig-03-09

Figura 1: Posició de les 'cascades MAPK en el procés de transmissió d'un senyal cap al nucli.

Una vegada el senyal extern s'ha convertit en un senyal intern aquestes xarxes el transmeten a través de vies que poden presentar una elevada complexitat. Tot i així habitualment estan formades per mòduls de components molt conservats entre diferents espècies tot i que a la bibliografia els components es troben amb noms ben diferents (Mos, raf, Taq1, p38, p42,...).

Una de les xarxes o cadenes de components més estudiades el formen les cascades MAP kinasa (Mitogen activated protein kinases MAPKs). Aquestes cadenes solen transferir el senyal (en forma de kinasa activada) des de les proximitats de la membrana i acabant per activar o desactivar altres components interns rellevants, com per exemple un factor de transcripció que actuarà al nucli cel·lular (figura 1). Es troben relacionades amb un ampli ventall d'estímuls i controlen una varietat extensa de processos (creixement, diferenciació, apoptosi,...). Es caracteritzen per estar formades per conjunts de Kinases, que s'activen per mitja de fosforilacions (catalitzats a la seva vegada per kinases) a residus tirosina i treonina en posicions molt conservades, juntament amb activitats fosfatases aparellades. Les reaccions de fosforilació/defosforilació es disposen en diferents nivells cadascun responsable de l'activació/desactivació d'una kinasa que s'encarrega de la fosforilació del següent nivell. Les cascades MAPK es troben molt conservades des dels llevats fins els éssers humans i per això son molt estudiades com a sistema model. A aquesta pràctica veurem algunes de les característiques principals de les cascades MAPK.

La pràctica

- 1) Prepara el model de la xarxa metabòlica MAPK tal com esta descrita a l'article (et pots ajudar amb la informació de l'apèndix d'aquest guió).
 - a. Prepara una figura per representar l'evolució de MAPK i MAPK-PP en vers el temps.
 - b. Fes una primera simulació per comprovar el funcionament correcte (evolució temporal determinista de 12000 segons, 1000 punts). La figura resultant hauria de ser igual a la figura 2 del paper adjunt [1]. A aquest model s'ha suposat que la dinàmica de les fosforilacions de les kinases és molt més ràpida que la de síntesi i degradació global de cada kinasa. Per tant no cal simular la seva síntesi i degradació. S'assumeix així que els seus nivells totals es conserven.
 - c. Comprova les relacions de conservació. Quantes n'hi ha i perquè son aquestes?. Quant modes elementals hi ha i amb quina part de la figura es corresponen. Quin és el rang de la matriu estequiomètrica?
- 2) Al model la transmissió comença a partir de l'activació de la primera kinasa MKKKK que representa de manera genèrica la primera kinasa del sistema real anomenada Raf. Aquesta s'activa per part del conjunt format per una kinasa (MKKKK) aparellada amb una GTPasa activada anomenada Ras-GTP. Aquest conjunt activador és la conseqüència de l'activació d'un receptor de membrana (RTK 'receptor tyrosin kinase') i per tant reflecteix l'arribada d'un senyal extern. Per tant es pot considerar que el nivell de Ras-MKKKK indica el senyal. Els nivells d'aquest conjunt oscil·len entre un nivell sense senyal i un nivell amb senyal que es poden mesurar com la velocitat màxima de fosforilació sense senyal (0.125 nM/s) i la velocitat màxima de fosforilació amb senyal (2.5 nM/s) del primer pas. Per tant l'arribada d'un senyal es pot tenir en compte com l'augment d'aquesta velocitat màxima (o increment de la quantitat d'enzim actiu). A la primera gràfica la Vmax de la cinètica de la primera reacció era 2.5 nM/s.
 - a. Per explorar millor el funcionament del sistema, grava fitxer del model inicial amb un altre nom. Per eliminar l'efecte de la retroinhibició n'hi ha prou amb

posar un valor de la K_i prou alt. Canvia el valor de la K_i a $1e6$. Executa el 'time course'. Fixat que no hi ha oscil·lació. Crea un gràfic on es representin les concentracions de MAPK-PP, MAPKK-PP i MAPKKK-P respecte del valor de la velocitat màxima de la reacció d'activació de MAPKKK. Crea una tasca 'Parameter Scan' per la tasca 'Steady State' i el Paràmetre de la velocitat màxima de la reacció d'activació (el senyal) varii entre els valors 0.05 i 0.5 amb 100 punts. Comenta la gràfica obtinguda en referència als comentaris d'amplificació i ultrasensitivitat de l'article original. Es a dir que et diuen les corbes (forma, canvi de nivell,...).

- b. Troba l'estat estacionari per a valors del senyal de 0, 0.025 i 0.25. Un no funciona. Perquè?. Per als altres, quin tipus d'estat estacionari es troba i quina estabilitat hi ha. Que t'indiquen els nivells de metabòlits i els fluxos en cada cas. Hi ha flux de matèria entre nivells?.
 - c. Crea una nova espècie amb el nom 'falsMAPK-PP' amb valor inicial de zero. Amb el valor del senyal al 100% (2.5) assigna la variable 'falsMAPK-PP' a la primera reacció com a modificador en lloc de MAPK-PP. Posa ara la variable k_i de la primera reacció al valor que tenia inicialment (9) i troba un nou estat estacionari mira el valor de MAPK-PP. Canvia el valor de 'falsMAPK-PP' a 300. Quin és el nou valor a l'estat estacionari de MAPK-PP?. Que et suggereix que l'estat estacionari de MAPK-PP sigui diferent si fals-MAPK-PP té un valor petit o gran?.
 - d. Un altra manera per veure l'efecte de la retroinhibició a l'estat estacionari. Crea un 'parameter scan' amb a tasca 'time course' i posa com a variable a canviar la concentració inicial de 'falsMAPK-PP' entre valors de 0 a 300 i 10 intervals. (senyal a 2.5). La retroinhibició fa canviar el resultat de l'estat estacionari? Que canvia (2 coses rellevants)?.
 - e. A tots els casos anteriors s'havia perdut la oscil·lació. Perquè creus que era?
- 3) Recupera els fitxer amb el model inicial i guarda'l amb un altre nom. Divideix per 10 totes les concentracions inicials de les kinases del model inicial. Executa un 'time course'. Que passa amb les oscil·lacions?. Comenta-ho respecte a l'apartat '**Sustained Oscillations in MAPK cascades**' del paper adjunt.
- 4) Anomena les diferències principals que observes entre aquest tipus de xarxa de senyal i les xarxes metabòliques clàssiques

Opcional

5) MCA

- a. Executa la tasca 'Metabolic Control Anàlisi' per als 3 casos de 'senyal' anterior. Un no funciona perquè?. Si estem mirant els efectes del senyal, quines columnes dels FCC i dels CCC ens interessin més?. Compara les columnes 1 i 2 dels FCC i CCC dels 2 casos que funcionen. A partir d'aquests coeficients com veus l'impacte del senyal a la xarxa quan el nivell d'activació es baix (0.025) i quan és alt (0.25). Veus algun canvi cada nivell?.
- b. Ja saps que els coeficients de la tasca 'Metabolic Control Analysis' provenen d'un anàlisi de sensibilitat tot i que es poden calcular a partir de les elasticitats i dels teoremes dels sumatoris de la MCT. Però no hi ha teoremes per tots els paràmetres. Un altra manera de calcular les sensibilitats per qualsevol paràmetre, a partir del mètode de diferències finites, el trobem a la tasca 'Sensitivities'. Assegurat que tens 'Senyal' al 0.025 i la k_i de la primera reacció a K_i a $1e6$. Ves a la tasca '**Sensitivities**' i escull 'subtask' 'steady state', 'function' 'non constant concentration of species'. Variable 'single

object' i escull com a objecte el valor del paràmetre **V1** de la primera reacció. Posa el '**delta factor**' a 0.0001. Executa el procediment i ves a la pestanya '**scaled**'. Compara els valors de la taula amb els valors obtinguts per les mateixes condicions i metabolits als CCC. Interpreta els valors de la taula assumint que els valors obtinguts (un d'ells en particular) es corresponen al paràmetre R de l'equació 1 de l'article. Mira després com canvien els coeficients si el 'senyal' és 2.5..

- c. Posa el valor inicial de 'fals-MAPK-PP' a un valor petit (p.ex. 1) i el senyal a 0.025. Fes el mateix que a la tasca 'Sensitivities' de l'apartat 'd' anterior i mira el valor del metabòlit MAPK-PP. Fes el mateix amb el senyal a 2.5. Hi ha diferència?. Repeteix amb el valor de 'fals-MAPK-PP' a 300. Com canvia la sensibilitat del 'senyal' quan fals-MAPK-PP és petit o quan és gran?

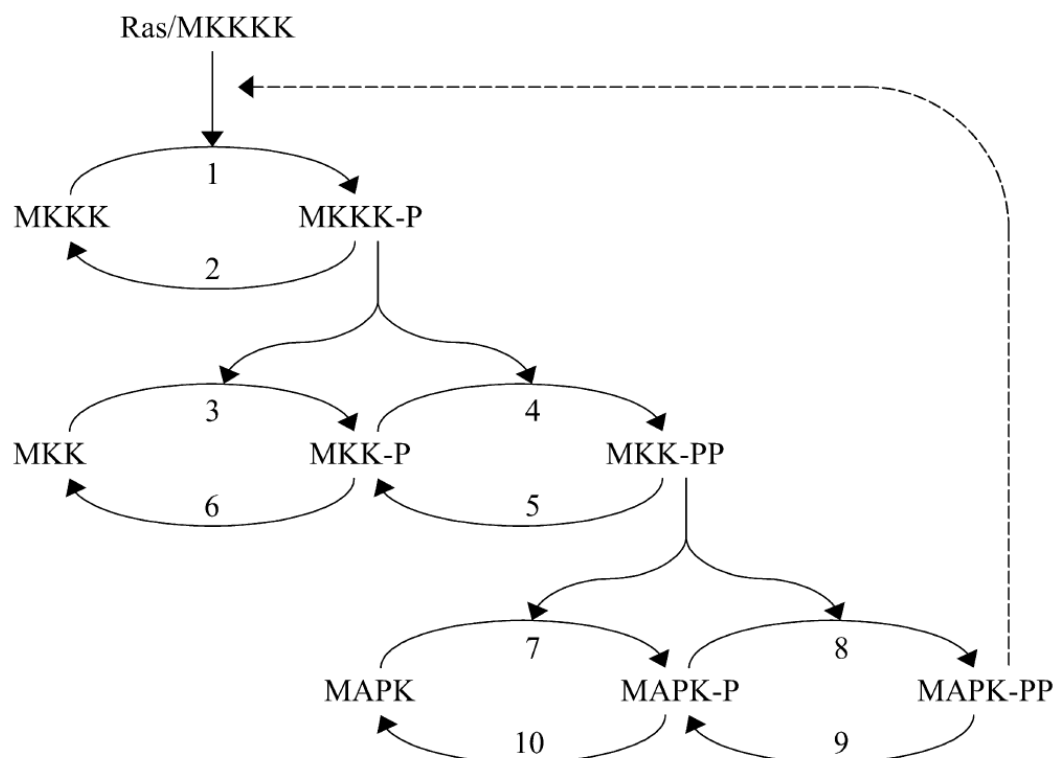
Referencies

1. Kholodenko BN. Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades. Eur J Biochem. 2000 Mar;267(6):1583-8.

APÈNDIX 1:

Descripció de la xarxa MAPK

Esquema de la xarxa:



Llista d'espècies

Unitats del model:

- Temps: segons
- Volum: litre
- Quantitat: nmol
- Velocitat de reacció: determinista

Espècie	Valor inicial	unitats
M3K	90	nmol/l
M3K-P	10	nmol/l
M2K	280	nmol/l
M2K-P	10	nmol/l
M2K-2P	10	nmol/l
MK	280	nmol/l
MK-P	10	nmol/l
MK-2P	10	nmol/l

Nota: El COPASI no guarda una funció definida per l'usuari si no es fa servir a cap reacció. Per tant si has de tancar el programa i vols guardar les cinètiques noves que has introduït, assegurat que surten a alguna funció encara que siguin incomplertes.

(r1) Activació M3K

(M3K -> M3K-P)

Cinètica:

$$v = \frac{V1 \cdot M3K}{\left(1 + \left(\frac{MK_2P}{Ki}\right)^n\right) \cdot (K1 + M3K)}$$

On:

- MK_2P (equivalent a MK-2P o MAPK-PP) és un modificador.
- M3K (MKKK) és el substrat
- La resta són paràmetres

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
V1	2.5	nmol·l ⁻¹ ·s ⁻¹
Ki	9	nmol·l ⁻¹
n	1	Adim.
K1	10	nmol·l ⁻¹

(r2) Inactivació M3K

(M3K-P -> M3K)

Cinètica:

$$v = \frac{V2 \cdot M3K_P}{KK2 + M3K_P}$$

On:

- M3K_P (M3K-P o MKKK-P) és el substrat
- La resta són paràmetres

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
V2	0.25	nmol·l ⁻¹ ·s ⁻¹
KK2	8	nmol·l ⁻¹

(r3) Fosforilació MAP2K

(M2K -> M2K-P)

Cinètica:

$$v = \frac{k3 \cdot M3K_P \cdot M2K}{KK3 + M2K}$$

On:

- M3K_P (MKKK-P) és un modificador
- M2K (MAP2K o MAPKK) és el substrat
- La resta són paràmetres

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
K3	0.025	s ⁻¹
KK3	15	nmol·l ⁻¹

(r4) Fosforilació MAP2K-P

(M2K-P → M2K-2P)

Cinètica:

$$v = \frac{k_4 \cdot M_{3K_P} \cdot M_{2K_P}}{K_{K4} + M_{2K_P}}$$

On:

- M3K_P (MKKK-P) és un modificador
- M2K_P (MKK-P) és el substrat
- La resta són paràmetres

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
K4	0.025	s ⁻¹
KK4	15	nmol·l ⁻¹

(r5) Desfosforilació MAP2K-2P

(M2K-2P → M2K-P)

Cinètica:

$$v = \frac{V_5 \cdot M_{2K_2P}}{K_{K5} + M_{2K_2P}}$$

On:

- M2K_2P (MKK-PP) és el substrat
- La resta són paràmetres

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
V5	0.75	nmol·l ⁻¹ ·s ⁻¹
KK5	15	nmol·l ⁻¹

(r6) Desfosforilació MAP2K-P

(M2K-P → M2K)

Cinètica:

$$v = \frac{V_6 \cdot M_{2K_P}}{K_{K6} + M_{2K_P}}$$

On:

- M2K_P (MKK-P) és el substrat
- La resta són paràmetres

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
V6	0.75	nmol·l ⁻¹ ·s ⁻¹
KK6	15	nmol·l ⁻¹

(r7) Fosforilació MAPK

(MK → MK-P)

Cinètica:

$$v = \frac{k7 \cdot M2K_2P \cdot MK}{KK7 + MK}$$

On:

- M2K_2P (MKK-PP o MAPKK-PP) és un modificador
- MK (MAPK) és el substrat
- La resta són paràmetres

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
K7	0.025	s ⁻¹
KK7	15	nmol·l ⁻¹

(r8) Fosforilació MAPK-P

(MK-P → MK-2P)

Cinètica:

$$v = \frac{k8 \cdot M2K_2P \cdot MK_P}{KK8 + MK_P}$$

On:

- M2K_2P (MKK-PP) és un modificador
- MK_P (MAPK-P) és el substrat
- La resta són paràmetres

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
K8	0.025	s ⁻¹
KK8	15	nmol·l ⁻¹

(r9) Desfosforilació MAPK-2P

(MK-2P → MK-P)

Cinètica:

$$v = \frac{V9 \cdot MK_2P}{KK9 + MK_2P}$$

On:

- MK_2P (MAPK-PP) és el substrat
- La resta són paràmetres

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
V9	0.5	nmol·l ⁻¹ ·s ⁻¹
KK9	15	nmol·l ⁻¹

(r10) Desfosforilació MAPK-P

(MK-P → MK)

Cinètica:

$$v = \frac{V_{10} \cdot MK_P}{K_{K10} + MK_P}$$

On:

- MK_P (MAPK-P) és el substrat
- La resta són paràmetres

Paràmetres:

paràmetre	valor	unitats
V10	0.5	nmol·l ⁻¹ ·s ⁻¹
KK10	15	nmol·l ⁻¹