

EFECTO DEL RUIDO INTRÍNSECO EN LA DINÁMICA DEL MÓDULO p53-Mdm2

L. CRUZ^a, N. FIGUEROA^{a†}, R. MULET^a Y J. PIÑERO^b

a) Facultad de Física, Universidad de La Habana, Cuba; infigueroa@fisica.uh.cu

b) Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, janetpgtz@gmail.com

† autor para la correspondencia

El estudio de la proteína p53 ha cobrado gran importancia en los últimos años debido a que se han apreciado mutaciones en ella en alrededor del 50% de los tumores observados en humanos. Estudios experimentales han evidenciado que células irradiadas inducen oscilaciones en las concentraciones de la p53 y su principal antagonista la proteína Mdm2, las cuales han motivado muchos modelos con el afán de explicar el mecanismo de estas oscilaciones así como su relevancia desde el punto de vista biológico. En este trabajo nos proponemos el estudio de un modelo que sea capaz de reproducir las oscilaciones. Para esto se hará una formulación estocástica del problema, a partir de la cual se obtendrán las ecuaciones deterministas que lo describen. Además emplearemos el algoritmo de Gillespie para simular el comportamiento del sistema y comparar con las predicciones deterministas y los gráficos experimentales reportados en la literatura.

The p53 protein plays a critical role in the prevention of cancer and it is inactivated in most of human cancers. Experimental studies show that stress conditions, like DNA damage, induce oscillations in the concentrations of the proteins p53 and in its main negative regulator, Mdm2. In this work we studied a model capable of reproducing these oscillations. We formulated the problem in a stochastic way and we obtained a deterministic system to describe this model. We used Gillespie's algorithm to simulate the behavior of the system, and to compare with the deterministic solution and with the experimental observations.

Palabras Clave. Noise fluctuation phenomena 05.40.Ca, Stochastic processes, 05.40.-a, Biological systems chemical kinetics in, 82.39.-k, 87.15.R-.

INTRODUCCIÓN

Los genes supresores de tumores juegan un importante papel en la regulación del crecimiento celular. Su mal funcionamiento puede provocar una proliferación anormal de la célula y el desarrollo de tumores. El p53 fue uno de los primeros genes supresores de tumores descubiertos. La proteína supresora p53 juega un importante papel en el desarrollo del cáncer y está inactiva en las células de casi todos los tumores malignos. Esta proteína es un factor de transcripción y se ha observado que aparece mutada en alrededor del 50% de los tumores observados en humanos [1].

Para entender las funciones de la proteína p53 es necesario estudiar el circuito que la regula. Una de las proteínas más importantes en este es la Mdm2. Ambas proteínas forman un circuito de autorregulación negativa, en el cual la p53 activada se une al gen que codifica la proteína Mdm2 y estimula la transcripción de este en un ARN mensajero (ARNm), a partir del cual se sintetiza la proteína. A su vez, la Mdm2 se une a la p53, inhibe su actividad como factor de transcripción y estimula su degradación [2].

En condiciones normales p53 se encuentra en concentraciones bajas en la célula. En presencia de señales de estrés tales como daño en el ADN su red se activa y aumenta su concentración en el medio celular, fundamentalmente por medio de mecanismos que inhiben su interacción con la Mdm2. Estudios ex-

perimentales, han evidenciado que las concentraciones de p53 y Mdm2 muestran un comportamiento oscilatorio, con cierto tiempo de retraso entre las oscilaciones de ambas proteínas, luego de que por ejemplo, la célula sea irradiada con rayos gamma [3], [4]. Mediciones realizadas por Naama Geva-Zatorsky y col. sobre 1000 células, mostraron grandes fluctuaciones en las amplitudes de las oscilaciones presentadas por distintas células e incluso entre los diferentes picos de las mismas células.

En este trabajo estudiaremos las oscilaciones de p53 y Mdm2 a partir de un modelo que describa las transformaciones individuales de cada proteína, considerando que la ocurrencia de una determinada reacción es un proceso aleatorio y con esta formulación reproduciremos uno de los modelos deterministas estudiados por Naama Geva-Zatorsky y col. Además recurriremos al algoritmo de Gillespie para estudiar la evolución del sistema considerando sus propiedades estocásticas y para observar las diferencias de los resultados que este arroja con respecto a las predicciones deterministas.

ESTUDIO ESTOCÁSTICO DEL SISTEMA P53-MDM2. MODELO DETERMINISTA.

Para entender el comportamiento de las proteínas p53 y Mdm2 es necesario estudiar la evolución de las concentraciones de ambas. La forma tradicional de enfrentar este problema es propo-

ner y resolver un sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias que describa la evolución temporal de las concentraciones de cada proteína. Sin embargo para que esta formulación sea válida se necesita que las concentraciones de ambas proteínas se puedan considerar como variables continuas. Esto es admisible cuando el número de moléculas es por ejemplo del orden de 10^{23} , lo cual constituye una buena aproximación de un sistema infinito en el cual tiene sentido considerar los valores medios de las concentraciones sin importar las fluctuaciones alrededor de estos. Sin embargo, cuando el número de moléculas es del orden de $10^3 - 10^4$, como ocurre con las cantidades celulares de p53 y Mdm2, entonces ya el sistema se hace discreto y la descripción determinista no es del todo correcta.

En este trabajo nos proponemos formular el problema planteando las transformaciones individuales de cada una de las especies consideradas con el objetivo de en primer lugar, reproducir las ecuaciones deterministas anteriores, y en segundo lugar realizar simulaciones estocásticas que permitan estudiar el sistema desde este punto de vista.

Consideraremos sólo tres especies en nuestra descripción: la proteína p53, la proteína Mdm2 y el ARN mensajero de mdm2, este último, elemento intermediario entre el p53 y el Mdm2. Identificar al ARN mensajero como al menos uno de los intermediarios entre el p53 y el Mdm2 parece evidente ya que la transcripción de un ARN mensajero es uno de los pasos obligatorios en la síntesis de las proteínas.

En las reacciones que se presentan a continuación aparece el gen que codifica la proteína Mdm2, pero no lo consideraremos en el posterior análisis del sistema, dado que su concentración no varía. En el modelo consideraremos las siguientes interacciones:

La p53, una vez que está activada (lo cual puede ocurrir por mecanismos que en este trabajo no consideraremos) actúa como factor de transcripción del gen que codifica la proteína Mdm2, formando un ARNm a partir del cual se sintetiza Mdm2, reacción que representaremos de la siguiente forma:



-Una vez formado el ARN mensajero (ARNm) ocurre la síntesis de la proteína:



-El ARNm se degrada con cierta velocidad:



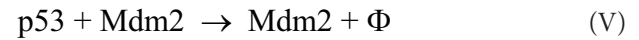
Donde por Φ entenderemos cualquier reaccionante distinto de los tres fundamentales que estamos considerando.

Otro elemento importante en este sistema es la síntesis de p53, la cual en este momento consideraremos que depende

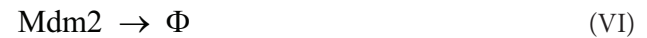
directamente de la cantidad de p53 que hay en el sistema, ya que se conoce que p53 estimula la síntesis de proteínas que a su vez estimulan el aumento de las concentraciones de esta proteína activa [5]:



Como explicamos anteriormente Mdm2 es un regulador negativo de p53, en este modelo solo consideraremos que estimula la degradación de p53, la cual depende directamente de la cantidad de cada una de estas proteínas en el sistema:



-Además consideraremos la degradación de Mdm2:



El estado del sistema en cada instante dependerá de las cantidades de p53, Mdm2 y ARNm, lo cual denotaremos por un vector $\vec{n} = \{n_1, n_2, n_3\}$, donde n_1 es la cantidad de moléculas de p53, n_2 la cantidad de moléculas de Mdm2 y n_3 la cantidad de ARNm en el sistema en el instante t.

Consideraremos que cada una de estas reacciones es un proceso que puede ocurrir aleatoriamente en el tiempo. Luego definiremos la probabilidad de ocurrencia de cada reacción en la unidad de tiempo la cual denotaremos por $W_i(\vec{n})$, donde $i = \{1, \dots, 6\}$ y que depende del estado en que se encuentra el sistema, por tanto para cada reacción tendremos:

$$W_1 = k_1 n_1 \quad W_2 = k_2 n_3$$

$$W_3 = k_3 n_3 \quad W_4 = k_4 n_1$$

$$W_5 = k_5 n_1 n_2 \quad W_6 = k_6 n_2$$

Donde k_i es la constante de velocidad de cada reacción.

Definamos los vectores de transformación de los reaccionantes para cada reacción:

$$\vec{v}_1 = \{0, 0, 1\} \quad \vec{v}_2 = \{0, 1, 0\}$$

$$\vec{v}_3 = \{0, 0, -1\} \quad \vec{v}_4 = \{1, 0, 0\}$$

$$\vec{v}_5 = \{-1, 0, 0\} \quad \vec{v}_6 = \{0, -1, 0\}$$

Cada componente de \vec{v}_i indica la transformación que sufre cada reaccionante en la reacción i-ésima

La evolución en el tiempo de la probabilidad de que el sistema se encuentre en el estado \vec{n} en el instante t se describe a través de la ecuación maestra, esta dependerá de la probabilidad de que el sistema transite desde cualquier estado al estado \vec{n} al ocurrir cualquiera de las reacciones anteriores y de que evolucione hacia otro estado si en el instante t se encontraba en el estado \vec{n} :

$$\frac{dP_{\vec{n}}(t)}{dt} = \sum_{i=1}^6 (W_i(\vec{n}-\vec{v}_i)P_{\vec{n}-\vec{v}_i}(t) - W_i(\vec{n})P_{\vec{n}}(t)) \quad (1)$$

Donde $W_i(\vec{n})P_{\vec{n}}(t)$ es la probabilidad por unidad de tiempo de que el sistema que se encuentra en el estado \vec{n} en el instante t , transite hacia otro nuevo estado al ocurrir la reacción i -ésima y $W_i(\vec{n}-\vec{v}_i)P_{\vec{n}-\vec{v}_i}(t)$ es la probabilidad por unidad de tiempo de que el sistema que se encuentre en el estado $\vec{n}-\vec{v}_i$ en el instante t transite hacia el estado \vec{n} al ocurrir la reacción i -ésima. Para obtener las ecuaciones de campo medio a partir de la ecuación maestra basta multiplicar ambos miembros por el vector \vec{n} y sumar sobre todas las posibles configuraciones, luego de lo cual obtenemos:

$$\frac{d\langle \vec{n} \rangle}{dt} = \sum_{i=1}^6 \vec{v}_i \langle W_i(\vec{n}) \rangle \quad (2)$$

Si definimos el vector adimensional: $\vec{x}(t) = \langle \vec{n}(t) \rangle / N$ y las velocidades de transición también adimensionales en la forma:

$$a_i(\vec{x}) = \frac{W_i(\vec{n})}{N} = \frac{W_i(N\vec{x})}{N} \quad (3)$$

Entonces obtenemos la formulación determinista del problema:

$$\frac{d\vec{x}}{dt} = \sum_{i=1}^6 \vec{v}_i a_i(\vec{x}) \quad (4)$$

O en forma extendida para cada componente de x :

$$\frac{dx_1}{dt} = k_4 x_1 - k_5 x_1 x_2 \quad (5)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = k_2 x_3 - k_6 x_2 \quad (6)$$

$$\frac{dx_3}{dt} = k_1 x_1 - k_3 x_3 \quad (7)$$

El sistema de ecuaciones (5), (6), (7) obtenido es análogo a uno de los sistemas propuestos por Naama Geva-Zatorsky y col. [3] el cual mostramos en (8), (9), (10).

$$\frac{dx}{dt} = \Gamma x - \alpha_{xy} xy \quad (8)$$

$$\frac{dy_o}{dt} = \beta y x - \alpha_o y_o \quad (9)$$

$$\frac{dy}{dt} = \alpha_o y_o - \alpha_y y \quad (10)$$

La formulación anterior del problema nos permite extraer cierta información del mismo. En primer lugar se pueden obtener los puntos fijos y hacer a su vez un análisis de la estabilidad de estos.

Para hallar los puntos fijos se debe resolver el sistema de ecuaciones:

$$\frac{dx_1}{dt} = 0 \quad (11)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = 0 \quad (12)$$

$$\frac{dx_3}{dt} = 0 \quad (13)$$

Esto lo podemos convertir en un sistema de dos ecuaciones con dos incógnitas despejando en (13) x_3 en función de x_1 :

$$f_1(x_1, x_2) = 0 = k_4 x_1 - k_5 x_1 x_2 \quad (14)$$

$$f_2(x_1, x_2) = 0 = k_2 \frac{k_1}{k_3} x_1 - k_6 x_2 \quad (15)$$

De modo que nos devuelve los siguientes valores para los puntos fijos, donde nos hemos quedado con la solución distinta de la trivial:

$$\{x_1^* = \frac{k_4 k_6 k_3}{k_1 k_2 k_5}, x_2^* = \frac{k_4}{k_5}, x_3^* = \frac{k_4 k_6}{k_2 k_5}\}$$

Para analizar la estabilidad basta escribir la matriz Jacobiana del sistema formado por (14) y (15) evaluada en los puntos fijos y hallar los autovalores de la misma:

$$\begin{pmatrix} -\lambda & -\frac{k_4 k_6 k_3}{k_1 k_2} \\ \frac{k_1 k_2}{k_3} & -k_6 - \lambda \end{pmatrix} \Rightarrow \lambda^2 + k_6 \lambda + k_8 k_4 = 0$$

Las soluciones de este sistema tendrán la forma:

$$\lambda_{1,2} = \frac{-k_6 \pm \sqrt{D}}{2}, \text{ cuyo discriminante es: } D = k_6^2 - 4k_6 k_4$$

La parte real de esta solución será siempre negativa ya que k_6 es una magnitud por definición positiva y la solución tendrá parte imaginaria distinta de cero en dependencia del valor del determinante.

Si, $D < 0$ y por tanto $k_6 < 4k_4$ entonces el punto fijo será oscilatorio y estable. De acuerdo a los resultados experimentales trabajaremos con los valores de los parámetros que reproducen el comportamiento oscilatorio.

El sistema de ecuaciones diferenciales ordinarias se puede resolver numéricamente escogiendo los valores de parámetros y condiciones iniciales reportados por Naama Geva-Zatorsky y col. El comportamiento del sistema se muestra en la Fig.1. Como se

puede apreciar la formulación determinista predice oscilaciones amortiguadas para p53 y Mdm2. En la figura se aprecia un retraso entre los picos de p53 y Mdm2, lo cual coincide con los resultados experimentales: ante la presencia de cierto daño en la célula que activa a p53, se aprecia un aumento en la concentración de la misma como un primer mecanismo para reparar el daño. Dado que el p53 es un factor de transcripción para el gen de mdm2, al aumentar su concentración se induce un incremento con cierto retraso de la concentración de la proteína Mdm2. A su vez, el aumento de Mdm2 favorece la degradación de p53, lo que disminuye su actividad como factor de transcripción lo que provoca una disminución de los niveles de Mdm2. Mientras persista el daño y p53 vuelva a aumentar su concentración, este ciclo permanecerá, aunque el modelo determinista muestra que las oscilaciones se amortiguarán con el tiempo. Las predicciones deterministas no reproducen todos los resultados experimentales. En estos se aprecian fluctuaciones en la amplitud de las oscilaciones que el modelo determinista no es capaz de reflejar.

SIMULACIÓN ESTOCÁSTICA

En la sección anterior obtuvimos a partir de la ecuación maestra la formulación determinista del circuito de p53 y Mdm2 considerando al ARN mensajero como intermediario entre las proteínas, pero el resultado obtenido no captura la variabilidad que presentan las células en la amplitud de los picos para las oscilaciones de p53 y Mdm2. En el estudio realizado por Naama Geva-Zatorsky y col. con el objetivo de reproducir las fluctuaciones observadas, modifican el sistema (8), (9) y (10) añadiendo un término de ruido aleatorio que multiplica a los términos de aumento de la concentración de p53 en las ecuaciones diferenciales (8) y (9), y considerando ruido de baja frecuencia logran reproducir las fluctuaciones en la amplitud de las oscilaciones observadas experimentalmente.

Nosotros en este trabajo hemos enfrentado el problema a partir de una formulación estocástica. En general la solución exacta de la ecuación maestra nos permitiría obtener todas las propiedades del sistema, pero esta solo es soluble cuando las probabilidades de transición son constantes o lineales. Esta característica de la ecuación maestra conlleva a que muchas veces se recurra a algoritmos computacionales para estudiar la evolución en el tiempo del sistema.

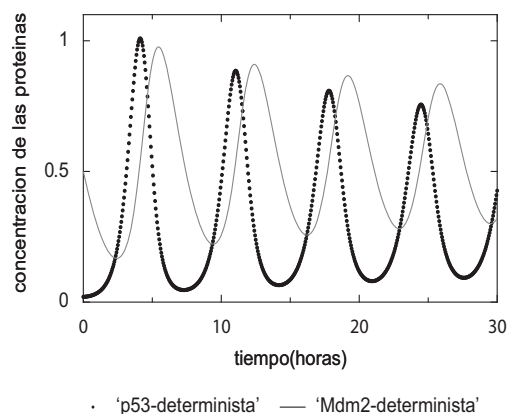


Figura 1: Solución numérica del sistema de ecuaciones $k_2=k_3=1.1\text{ h}^{-1}$, $k_4=2\text{ h}^{-1}$, $k_5=3.7\text{ h}^{-1}$, $k_6=0.9\text{ h}^{-1}$, con condiciones iniciales: $x_1=0.02$, $x_2=0.5$, $x_3=0.2$

En este trabajo emplearemos el Algoritmo de Gillespie [6] como herramienta para apreciar la evolución del sistema estocástico. Los parámetros empleados en las simulaciones determinista y estocástica se escogieron de forma tal que satisfagan las condiciones para observar oscilaciones estables, según el análisis de estabilidad realizado anteriormente. En la Fig.2 se muestran los resultados del Algoritmo de Gillespie para el sistema que estamos estudiando con el mismo conjunto de parámetros y de condiciones iniciales que se emplearon para obtener la solución del sistema de ecuaciones diferenciales deterministas.

La simulación, como se puede apreciar devuelve oscilaciones no amortiguadas, que presentan gran variabilidad en las amplitudes de los diferentes picos, según muestra la Fig.2 y por tanto recoge la esencia de las oscilaciones observadas por Naama Geva-Zatorsky y col. Esto permite afirmar que las variaciones en la amplitud de las oscilaciones observadas experimentalmente se deben a las fluctuaciones propias del sistema. Este, siendo esencialmente finito, es un sistema en el cual pequeños cambios en las cantidades de cada proteína pueden ser significativos con respecto a los valores medios. Esto demuestra que no es necesario incluir factores de ruido multiplicativo a la velocidad de producción de las proteínas [3] para aproximarse a reproducir los resultados experimentales.

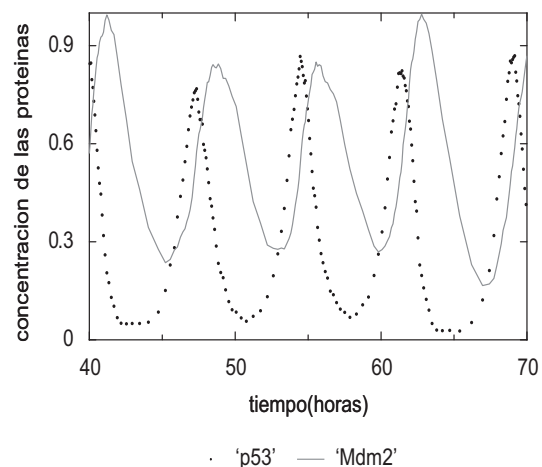


Figura 2: Oscilaciones obtenidas para las concentraciones de las proteínas p53 y Mdm2 empleando el algoritmo de Gillespie.

CONCLUSIONES

En sistemas de pocas partículas la formulación determinista que plantea la evolución en el tiempo de los valores medios no reproduce el comportamiento real del sistema, ya que en este caso las fluctuaciones con respecto a los valores medios pueden ser importantes y cambiar la dinámica del sistema. Tal es el caso del modelo presentado en este trabajo, en el cual el análisis determinista predice oscilaciones amortiguadas y es la simulación estocástica la que captura las fluctuaciones en la amplitud de las oscilaciones. Con el estudio aquí realizado pudimos comprobar que las fluctuaciones en el número de proteína p53 en una célula es una cualidad intrínseca del sistema que es finito y en el cual las reacciones ocurren aleatoriamente, cambiando las cantidades de proteínas, de forma que las amplitudes fluctúen tal y como predice el experimento y que por tanto no es necesario añadir términos de ruido

que indiquen variabilidad en la producción de la proteína, ni en ningún otro término del sistema determinista.

-
- [1] R. Lev Bar-Or, R. Maya, L.A. Segel, U. Alon, A.J. Levine and M. Oren, "Generation of oscillations by the p53-mdm2 Feedback loop: A theoretical and experimental study", PNAS 97: 11250-11255 (2000).
- [2] B. Vogelstein, D. Lane and A.J. Levine, "Surfing the P53 network", Nature 408: 307-310 (2000).
- [3] N. Geva-Zatorsky, N. Rosenfeld, S. Itzkovitz, R. Milo, A. Sigal, E. Dekel,

T. Yarnitzky and U. Alon, "Oscillations and variability in the p53 system", Molecular Systems Biology, 2: 2006.0033 (2006).

[4] G. Lavah, N. Rosenfeld, A. Sigal, N. Geva-Zatorsky, A.J. Levine, M.B. Elowitz and U. Alon, "Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells", Nature Genetics 36:147-150 (2004).

[5] S.L. Harris, A.J. Levine, "The p53 pathway: positive and negative feedback loops", Oncogene 24: 2899-2908 (2005).

[6] Daniel T. Gillespie "Exact Stochastic of Coupled Chemical Reactions" (1977).