



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,
BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

DESARROLLO DE UN MODELO FENOMENOLÓGICO PARA LA VÍA LISOSOMAL
DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

CRISTOPHER PATRICIO SOTO REYES

PROFESOR GUÍA:
ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
CLAUDIA ALTAMIRANO GÓMEZ
ALVARO OLIVERA NAPPA

SANTIAGO DE CHILE
2018

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
POR: CRISTOPHER PATRICIO SOTO REYES
FECHA: AGOSTO 2018
PROF. GUÍA: ZIOMARA GERDTZEN HAKIM

DESARROLLO DE UN MODELO FENOMENOLÓGICO PARA LA VÍA LISOSOMAL DE DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS

El cultivo de células animales ha crecido continuamente en los últimos años, debido al avance en las técnicas de cultivo y al entendimiento de los procesos celulares. La venta de productos obtenidos a partir de estas técnicas deja importantes utilidades y la obtención de nuevos medicamentos deja grandes ganancias sociales.

Dentro de los factores que ayudan a mejorar la productividad, se ha estudiado la posibilidad de intervenir los procesos de apoptosis y degradación de proteínas. En este contexto es donde cobra relevancia la obtención de modelos que estudien estas vías.

En este documento se busca estudiar y modelar la degradación de proteínas via lisosomal. Para ello se realiza una investigación bibliográfica, se eligen los componentes del modelo, se plantean reacciones para poder deducir ecuaciones y simularlas.

Se obtienen gráficos que describen diferentes procesos del sistema. Uno de los principales resultados fue la ratificación de que la degradación via lisosoma es más lenta que el replegamiento de proteínas. Las proteínas son degradadas entre 16 y 30 minutos luego de comenzada la simulación. Se logra describir tanto la generación de autolisosoma como la degradación de este.

Se propone y realiza una simplificación de la formación del complejo Atg12Atg5Atg16, la que no altera visiblemente la degradación de autolisosoma. Por otra parte, se propone en un futuro modificar las condiciones gatillantes del estrés celular, con el fin de robustecer el modelo

Finalmente se destaca la utilidad que puede tener un modelo de degradación de proteínas agregadas vía lisosomal. La aplicación de este podría generar utilidades y posicionar a la industria en un nivel más competitivo.

A mi madre.

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Antecedentes generales	1
1.2. Descripción del proyecto	2
1.3. Motivación	3
1.4. Objetivos	3
1.4.1. Objetivo general	3
1.4.2. Objetivos específicos	3
1.5. Marco teórico	4
1.5.1. Descripción de elementos considerados	4
1.5.2. Descripción del proceso	13
2. Metodología	20
2.0.1. Herramientas utilizadas	20
2.0.2. Descripción del procedimiento	20
3. Resultados y discusiones	22
3.1. Modelo	22
3.1.1. Consideraciones preliminares	22
3.1.2. Ecuaciones	25
3.2. Parámetros	40
3.2.1. Velocidad máxima de transcripción y constante de afinidad	40
3.2.2. Cantidad total de proteínas	40
3.2.3. Constantes cinéticas de asociación a un complejo	41
3.2.4. Constantes cinéticas de sustitución de un componente	42
3.2.5. Constantes cinéticas de fosforilación	43
3.2.6. Constante cinética de desfosforilación	43
3.2.7. Constantes cinéticas de disociación de un complejo	43
3.2.8. Constante cinética de degradación de un componente	44
3.2.9. Constante cinética de escisión	45
3.2.10. Constantes cinéticas de formación de vesícula	45
3.2.11. Constante cinética de plegamiento	45
3.2.12. Constantes cinéticas del proceso de traducción	45
3.2.13. Constantes cinéticas del transporte de lípidos	45
3.2.14. Constantes de Michaelis Menten	46
3.3. Simulaciones	46
3.3.1. Subsistemas	46

3.3.2. Simulación global del modelo	60
3.4. Discusiones generales	69
4. Conclusiones y proyecciones	71
Bibliografía	72
A. Memoria de cálculos	78
A.1. Reacciones	78
A.1.1. Reconocimiento proteína mal plegada	78
A.1.2. Producción de proteína	79
A.1.3. Regulación traducción	79
A.1.4. Regulación transcripción	80
A.1.5. Formación de membrana de autofagosoma	80
A.1.6. Formación de autolisosoma	84
A.1.7. Degradación	85
A.2. Ecuaciones	85
A.2.1. Complejo BiP proteína mal plegada	85
A.2.2. Fosforilación de <i>eIF2α</i>	86
A.2.3. Fosforilación del complejo Beclin	87
A.2.4. Fosforilación de PtdIns	87
A.2.5. Escisión de proLC3	87
A.2.6. Transporte de lípidos	87
A.2.7. Promotor de transcripción	88
B. Organización y valores de los componentes del modelo	90
B.1. Variables y parámetros	90
B.2. Clasificación de parámetros	93
B.3. Valores de parámetros	96
C. Red de interacciones	99
D. Código	101
D.1. Código de ecuaciones	101
D.2. Código Main	105

Índice de Tablas

3.1. Abreviación de los elementos participantes en las ecuaciones del modelo. . . .	22
B.1. Variables del modelo de degradación de proteínas.	90
B.2. Parámetros del modelo de degradación de proteínas.	92
B.3. Agrupación y clasificación de los parámetros a utilizar en el modelo debido a la función que acompaña.	94
B.4. Valores utilizados en la simulación del modelo propuesto.	96

Índice de Ilustraciones

1.1. Porcentaje del mercado de proteínas producidos por células animales y no animales [1].	1
1.2. Etapas de la producción proteica, la linea 2 representa la correcta síntesis de la proteína, en cambio, las lineas 1 y 3 representan la formación de agregados y la degradación de las proteínas mal plegadas respectivamente [2].	2
1.3. Estructura secundaria de proteínas de la familia Hsp70, en rojo las estructuras de alfa hélice y en amarillo las láminas beta. Se muestra el dominio NBD encargado de la hidrólisis de ATP y el dominio SBD, en donde se encuentra el sitio de unión a las proteínas mal plegadas y el sector que funciona como tapa, permitiendo versatilidad a BiP para funcionar en distintas condiciones. Imagen adaptada desde Ratheesh et al [3].	5
1.4. Estructura secundaria de PERK, en rojo las estructuras de alfa hélice y en amarillo las láminas beta. En el extremo superior se encuentra el extremo N terminal y en el inferior el extremo C terminal, es en este sitio donde se encuentra el dominio quinasa con su sitio activo que incluye el aminoácido Thr980 [4].	6
1.5. mRNA de ATF4, muestra los diferentes ORF que posee y sus tamaños. Adaptada de Richard J. Jackson et al [5].	7
1.6. Atg4 escinde a pro-LC3 para formar LC3-I, el cual se conjuga con PE para formar LC3-II. Esta última conformación, en conjunto con algunas proteínas Atg ayudan a la elongación de la membrana del autofagosoma. Adaptada de Novus Biologicals [6].	8
1.7. Muestra la acción de las proteínas Atg para formar LC3-II en el proceso de elongación de la membrana del autofagosoma. E1 y E2 representan la actividad E1-like y E2-like. Adaptada de Füllgrabe et all [7].	9
1.8. Muestra como ULK1 y Atg13 se desfostorilan luego de abandonar mTOR el complejo, aumentando de esta forma la actividad kinasa del complejo. Adaptada de Füllgrabe et all [7].	10
1.9. Muestra la activación de mTOR debido a la acción de los aminoácidos arginina, leucina, glutamina y α -cetoglutarato [8].	11
1.10. Muestra la doble acción inhibitoria de Bcl-2, tanto para la autofagia como para la apoptosis. En el caso de la autofagia al unirse con Beclin 1 previene la formación del complejo Beclin 1 y de esta forma frena el proceso de nucleación. Adaptada de Marquez et all [9].	12

1.11. La etapa de nucleación comienza con la inhibición del inhibidor Bcl.2, en la imagen se muestra las proteínas involucradas en el complejo Beclin 1. Atg9 se muestra como el intermediario entre la fase de nucleación y recuperación. Adaptada de Füllgrabe et all [7].	12
1.12. La generación de PtdIns3P mediante la acción de Vps34 permite la unión de estas a las proteínas WIPI en las cercanías del omegasoma (un subsominio del ER rico en PtdIns3P). Con ayuda de éstas moléculas y Atg9 se forma el fagóforo. Posteriormente WIPI secuestra al complejo Atg12-Atg5-Atg16 mediante la unión con Atg16, generando el acople de LC3 con PtdEtn (PE). Las proteínas WIPI también pasan a formar parte de la membrana del autofagosoma. Adaptada de Proikas et al [10].	13
1.13. Diagrama del proceso de degradación de proteínas mal plegadas, considerando solo los elementos participantes en el modelo.	14
1.14. <i>A</i> muestra el dímero BiP-PERK en la membrana del ER, en rojo el estímulo de proteína mal plegada. En <i>B</i> se observa la disociación de BiP-PERK, la captura de proteína mal plegada por parte de BiP y la homodimerización de PERK junto con su autofosforilación.	15
1.15. <i>A</i> muestra el funcionamiento en condiciones sin estrés, con eIF2 α desfosforilado. <i>B</i> muestra el factor eIF2 α fosforilado (en verde) por la acción de PERK (en azul) debido a que la célula se encuentra sometida a estrés. eIF2 α disminuye la traducción global de proteínas, pero se une a la subunidad 40S del ribosoma para comenzar la lectura del mRNA de ATF4.	16
1.16. Se puede apreciar como el factor ATF4 entra al núcleo y activa la lectura de las proteínas CHOP, LC3, ATG12, entre otras. También se muestra la acción de CHOP sobre la transcripción de BH3-only.	17
1.17. Se aprecian las 4 etapas de la formación del autofagosoma. En Azul la etapa de iniciación, en la que se encuentran los receptores de señales de estrés, como mTOR y los primeros efectores como Ulk1. En amarillo la etapa de nucleación, que corresponde a la unión de las proteínas Atg involucradas en la generación del fagóforo. En rosado se muestra la etapa de elongación, en la que se lipida LC3 por medio del complejo Atg12-Atg5-Atg16, Atg4 y la participación de proteínas WIPI. Finalmente, en verde se muestra el proceso de recuperación, que consiste en la generación de PtdIns3P, captura de las primeras membranas, participación en lipidación de LC3 al formar PE a partir de PtdIns3P y la finalización de la membrana a partir de la acción de Atg9 y LC3. Adaptada de Mehrpour et al [11].	17
1.18. Muestra el inicio del proceso de formación de la membrana del autofagosoma. El complejo Beclin es el encargado de activar a PtdIns3P, el que se ancla en los alrededores de la proteína transmembrana VMP1. Este lípido es fundamental para el acople de LC3 a la membrana, funcionando como señal de unión de una serie de proteínas, por ejemplo WIPI. Posteriormente de la formación de esta estructura, Atg9 es el encargado de administrar lípidos al formar vesículas de transporte [12].	18
2.1. Esquema del trabajo realizado, se muestran los pasos seguidos para la obtención del modelo de degradación de proteínas.	21

3.1. Sección de reconocimiento de proteína mal plegada.	26
3.2. Sección de homodimerización y fosforilación de PERK.	27
3.3. Sección de fosforilación del factor eIF2 α	28
3.4. Sección de producción de ATF4 y regulación de traducción.	29
3.5. Sección de iniciación de formación de membrana del autofagosoma.	31
3.6. Sección de nucleación en la formación de la membrana del autofagosoma.	32
3.7. Sección de producción del complejo Atg12-Atg5-Atg16.	34
3.8. Sección de activación de LC3.	36
3.9. Sección de transporte de lípidos.	38
3.10. Sección de formación de las vesículas autofagosoma, lisosoma y autolisosoma.	39
3.11. Sección de reconocimiento de proteína mal plegada.	47
3.12. Subsistema de reconocimiento de proteína mal plegada y posterior replegamiento. Donde B corresponde a proteína BiP, MP a proteína mal plegada y PP a proteína correctamente plegada.	48
3.13. Sección de homodimerización y fosforilación de PERK.	48
3.14. Subsistema de fosforilación de proteínas PERK y eIF2 α . Donde B corresponde a BiP, P a PERK, BP al complejo conformado por BiP y PERK, P_p a PERK fosforilado, e al factor eIF2 α y e_p al mismo factor fosforilado	49
3.15. Sección de producción de ATF4 y regulación de traducción.	49
3.16. Traducción de proteínas. Donde los valores corresponden a los RNAs mensajeros de Atg12, CHOP, BH3-only y proLC3.	50
3.17. Transcripción de proteínas. Donde A12 corresponde a la proteína Atg12 y C a CHOP.	51
3.18. Transcripción de proteínas. Donde AF4 corresponde al factor ATF4, BH a BH3-only y pL a proLC3.	51
3.19. Sección de nucleación en la formación de la membrana del autofagosoma.	52
3.20. Subsistema iniciación y nucleación en la formación de la membrana del autofagosoma. Donde U corresponde al complejo Ulk, BE al complejo Beclin, BE_p al mismo complejo en su forma fosforilada, Bcl a Bcl-2, BEBcl al complejo conformado por Beclin y Bcl-2, BHBcl al complejo formado por BH3-only y Bcl-2, Ptd a PtdIns y Ptd_{3p} a PtdIns3P	53
3.21. Nucleación sin inhibidor BH. Donde U corresponde al complejo Ulk, BE al complejo Beclin, BE_p al mismo complejo en su forma fosforilada, Bcl a Bcl-2, BEBcl al complejo conformado por Beclin y Bcl-2, BHBcl al complejo formado por BH3-only y Bcl-2, Ptd a PtdIns y Ptd_{3p} a PtdIns3P	54
3.22. Sección de producción del complejo Atg12-Atg5-Atg16.	55
3.23. Subsistema de formación del Complejo A12A5A16. Donde A corresponde a las proteínas Atg con su correspondiente número.	55
3.24. Sección de activación de LC3.	56
3.25. Subsistema de Activación y lipidación de LC3. Donde pL corresponde a proLC3, LI a LC3-I, A a las proteínas Atg con su correspondiente número, LIPE al complejo conformado por LC3-II y PE y la unión de estas siglas a la formación de complejos.	57
3.26. Sección de formación de las vesículas autofagosoma, lisosoma y autolisosoma.	58
3.27. Subsistema de Transporte de lípidos. Donde L corresponde a lípidos no transportados, A9 a la proteína intermembrana Atg9 y L^* a lípidos transportados.	59

3.28. Subsistema de formación y degradación del autolisosoma. Donde $LC3^*$ corresponde a LC3 activo y unido a proteína mal plegada, Ptd_{3p} a PtdIns3P, Atf a autofagosoma, Lis a lisosoma y Al al autolisosoma.	59
3.29. Simulación del modelo. Se muestra la primera etapa simulada hasta los 1000 segundos. Donde PP representa la proteína correctamente plegada, MP a la proteína mal plegada y B a BiP.	61
3.30. Simulación del modelo. Se muestra la degradación del autolisosoma hasta los 2000 segundos. Donde P_p representa a PERK fosforilado, e_p al factor eIF2 α , Ptd_{3p} a PtdIns3P, A a las proteínas Atg con su correspondiente número, pL a proLC3, LIPE al complejo formado por LC3-II y PE, Atf al autofagosoma y Al al autolisosoma.	62
3.31. Diagramas original y propuesto para generación del complejo A12A5A16.	63
3.32. Simulación del modelo modificado. Donde P_p representa a PERK fosforilado, e_p al factor eIF2 α , Ptd_{3p} a PtdIns3P, A a las proteínas Atg con su correspondiente número, pL a proLC3, LIPE al complejo formado por LC3-II y PE, Atf al autofagosoma y Al al autolisosoma.	64
3.33. Diagrama del proceso, en rojo las vías y componentes inhibidos debido a la ausencia de estrés nutricional.	65
3.34. Simulación del modelo sin presencia de estrés.	66
3.35. Simulación del modelo sin presencia de estrés y con concentración inicial de proteína mal plegada igual a 0.	67
3.36. Simulación del modelo sin presencia de estrés y con concentración inicial de proteína mal plegada igual a 0.	68
A.1. Atg12 se conjuga con Atg5 y Atg16 mediante una serie de procesos mediados por enzimas con actividad análogo a E1 y E2, para finalmente formar un tetrámero con actividad E3. Adaptada de Randall-Demllo et all [13].	82
C.1. Esquema simplificado de las interacciones propuestas en el modelo.	100

Listings

D.1. Código de ecuaciones del modelo global de degradación de proteínas.	101
D.2. Código principal para ejecución de ecuaciones del modelo de degradación de proteínas.	105

Capítulo 1

Introducción

1.1. Antecedentes generales

El cultivo de células animales se ha transformado en el principal mercado para la producción de proteínas en el ámbito clínico [14]. Esto debido a ventajas respecto a sus competidoras no animales, por ejemplo, su nivel de correcto plegamiento y modificaciones post-traduccionales [14].

Otro factor relevante ha sido el avance en las técnicas de cultivo y el entendimiento de los procesos celulares, en especial del metabolismo y la apoptosis. Esto ha logrado aumentar la productividad, logrando posicionar a las células animales como el principal actor del mercado (Figura 1.1) [14, 1]. Recaudando en 2016 sobre US\$200 billones (drogas biológicas y basadas en proteínas). Además de contar con la presencia de ocho drogas, cultivadas en células animales, en el top 10 de ventas, con un mercado sobre los US\$55 billones [15, 16].

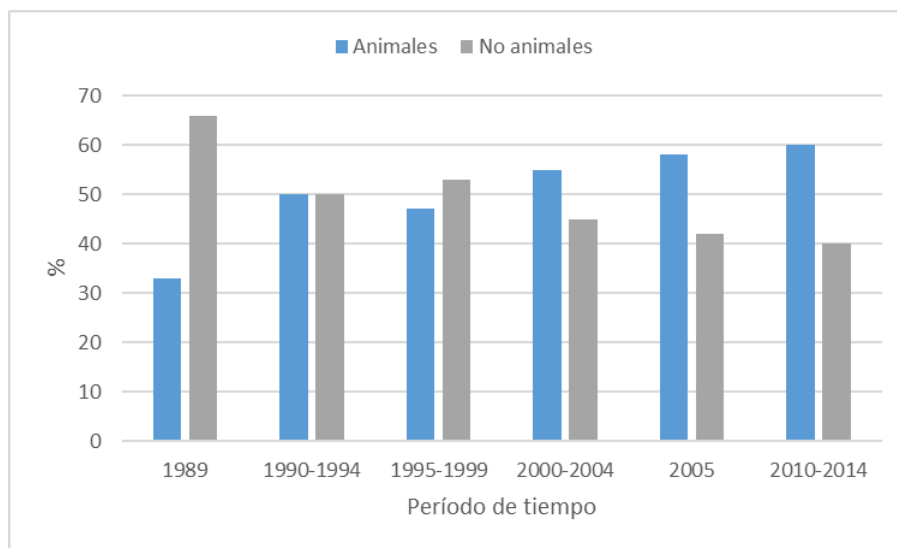


Figura 1.1: Porcentaje del mercado de proteínas producidos por células animales y no animales [1].

La ingeniería genética ha jugado un rol relevante en el aumento de la productividad, los esfuerzos se han centrado en disminuir la acumulación de productos que pueden resultar tóxicos para las células. De igual modo, en los últimos años se ha investigado la posibilidad de aumentar dicha eficiencia mediante la intervención en los procesos de apoptosis y glicosilaciones [17]. Ésto se debe a que en el retículo endoplasmático (ER) se procesan y sintetizan las proteínas y lípidos de las vías secretoras, por lo cual, muchos estudios sugieren que es en éste organelo donde se encuentra el cuello de botella del proceso de producción proteica.

En este contexto es donde cobra relevancia el concepto de estrés de retículo endoplasmático, el cual es inducido, entre otros factores, por el aumento de la concentración de proteínas mal procesadas o mal plegadas.

Las células poseen mecanismos de control de calidad para lidiar con estos factores inductores de estrés, es el llamado respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Éste tiene dos principales funciones, la primera es recuperar el correcto funcionamiento de la célula y la segunda es, si no se consiguen restablecer las funciones, la apoptosis. Las respuestas se gatillan por la presencia de proteínas mal plegadas y/o agregadas (líneas 1 y 3 de la Figura 1.2)[2].

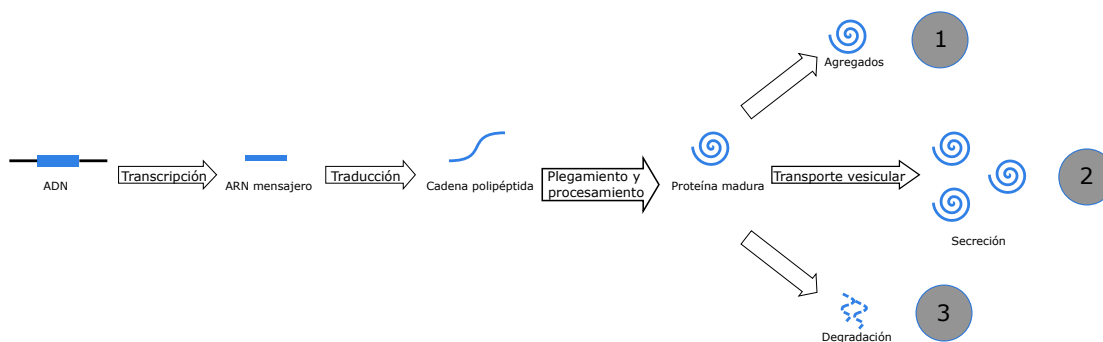


Figura 1.2: Etapas de la producción proteica, la línea 2 representa la correcta síntesis de la proteína, en cambio, las líneas 1 y 3 representan la formación de agregados y la degradación de las proteínas mal plegadas respectivamente [2].

El mecanismo de control UPR genera la activación de vías de degradación de proteínas, los principales se encuentran asociados al ER y son llamados ERAD I y ERAD II. ERAD I se asocia a la retrotranslocación de las proteínas y a su posterior degradación mediante proteosoma, así mismo, se vincula a la degradación de proteínas no agregadas. Por otra parte, ERAD II se asocia a la degradación de agregados proteicos mediante la acción de autolisosoma [18].

1.2. Descripción del proyecto

En este trabajo se estudia la vía lisosomal de degradación de proteínas en células animales, una de las principales rutas para la degradación de agregados proteicos.

Se genera un modelo inicial que describa el funcionamiento parcial de ERAD II, identifi-

cando elementos relevantes, con el fin de realizar un primer acercamiento al funcionamiento de dicha vía.

Se establece como condición gatillante del proceso la falta de nutrientes, comúnmente conocida como starvation. Esta condición produce el aumento de proteínas mal plegadas y a su vez la inhibición de elementos regulatorios.

Las ecuaciones de este modelo se resuelven y muestran gráficamente mediante la utilización del software Matlab[®].

1.3. Motivación

La generación de un modelo de degradación de proteínas en células animales, facilitará y contribuirá al desarrollo del conocimiento en ésta área. Así mismo será una herramienta para estudios en diversas materias, como publicaciones médicas, científicas, estudios de procesos que involucren cepas usadas en procesos industriales, entre otras. De ésta forma, el modelo aporta potencialmente al bienestar económico y social de las personas que se ven afectadas con dichos estudios.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Estudiar y modelar la degradación de proteínas vía lisosoma.

1.4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la degradación lisosomal de proteínas en células animales.
- Escoger los componentes a analizar para la generación del modelo.
- Plantear ecuaciones que describan el proceso estudiado.
- Plantear y escoger valores para los parámetros del modelo.
- Simular el modelo planteado en subconjuntos y de manera integral.
- Estudiar el comportamiento de los gráficos simulados.

1.5. Marco teórico

1.5.1. Descripción de elementos considerados

A continuación se describe estructural y funcionalmente cada uno de los elementos considerados en este estudio:

Binding immunoglobulin protein (BiP)

Esta proteína pertenece a la familia de las Hsp70 y es la más común del retículo en células animales. Estas moléculas chaperonas están involucradas en el plegamiento proteico [19].

BiP posee dos grandes dominios, el primero está ubicado en el extremo N terminal y es llamado nucleotid binding domain (NBD), éste posee actividad ATPasa, hidrolizando ATP a ADP. Cuando BiP se encuentra unido a ATP el segundo dominio se abre, en cambio, si se encuentra ligado a ADP el segundo dominio se cierra. Éste segundo dominio es llamado substrate binding domain(SBD) y puede subdividirse en 2 subdominios, el primero posee una alta capacidad de unión con residuos hidrofóbicos y neutros, debido a su estructura de beta-sandwich de dos láminas beta antiparalelas de cuatro hebras cada una, el segundo subdominio funciona como una "tapa" que se abre o cierra dependiendo del estado del dominio NBD (ver Figura 1.3) [19].

Cuando NBD está unido a ADP, el sustrato se acopla de mejor manera al sitio de unión de SBD, por lo que la afinidad será alta. En cambio cuando NBD se encuentra unido a ATP, existirá una alta tasa de asociación y disociación, pero una menor afinidad a SBD. Al ser SBD un dominio con alta afinidad a largos residuos hidrofóbicos, tiende a unirse a proteínas mal o parcialmente plegadas, que exponen gran parte de sus sitios hidrofóbicos hacia el exterior, dando de esta forma otra oportunidad de plegamiento a sus proteínas sustrato.

Protein ER-localized transmembrane kinase (PERK)

PERK es una proteína transmembrana ubicada en el retículo. Es una de las tres principales proteínas encargadas de traducir las señales de estrés. Las señales provocan la oligomerización del extremo N terminal del dominio orientado al lumen del ER (extremo superior de la Figura 1.4), lo que genera la trans-autofosforilación en el dominio kinasa ubicado cerca del extremo C terminal (extremo inferior de la Figura 1.4) [4].

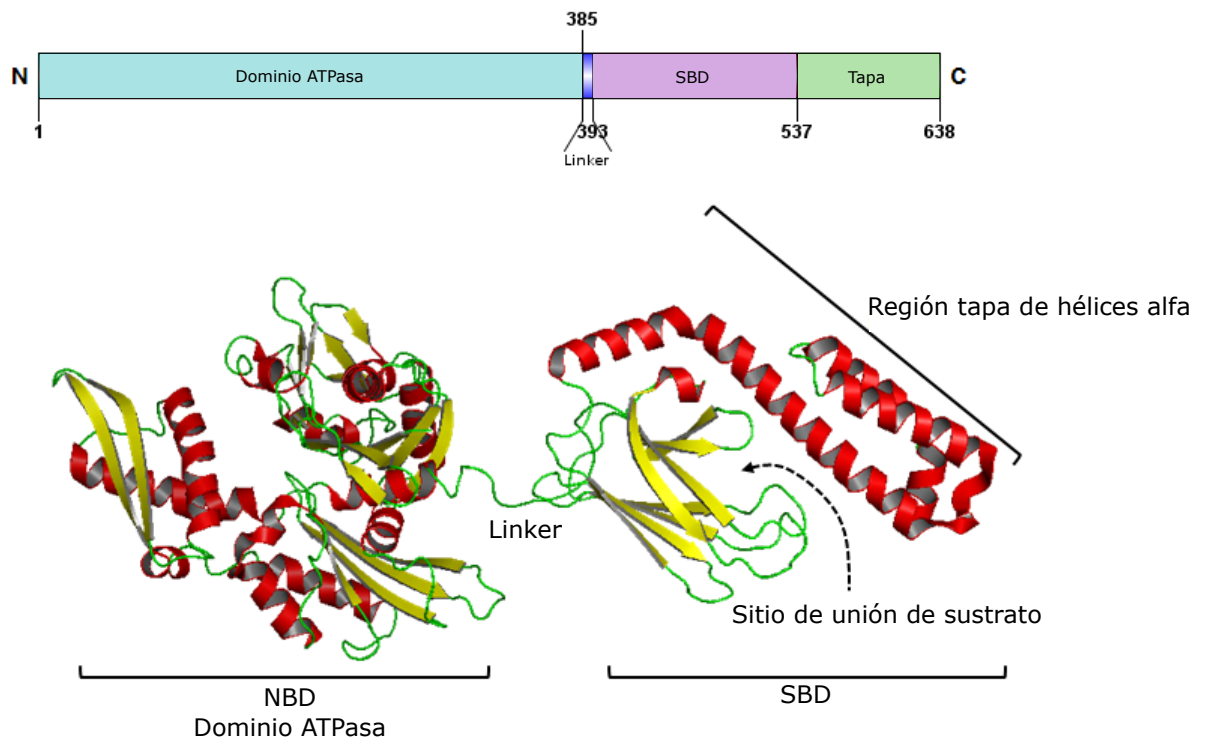


Figura 1.3: Estructura secundaria de proteínas de la familia Hsp70, en rojo las estructuras de alfa hélice y en amarillo las láminas beta. Se muestra el dominio NBD encargado de la hidrólisis de ATP y el dominio SBD, en donde se encuentra el sitio de unión a las proteínas mal plegadas y el sector que funciona como tapa, permitiendo versatilidad a BiP para funcionar en distintas condiciones. Imagen adaptada desde Ratheesh et al [3].

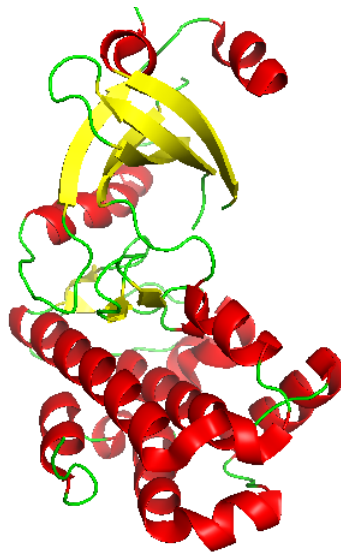


Figura 1.4: Estructura secundaria de PERK, en rojo las estructuras de alfa hélice y en amarillo las láminas beta. En el extremo superior se encuentra el extremo N terminal y en el inferior el extremo C terminal, es en este sitio donde se encuentra el dominio quinasa con su sitio activo que incluye el aminoácido Thr980 [4].

Eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α)

eIF2 α corresponde a una subunidad del complejo eIF2, el que es responsable de iniciar la transcripción, hidrolizando GTP en GDP en presencia de Met-tRNA y la subunidad 40S del ribosoma [4]. La fosforilación del factor eIF2 α genera una inhibición de la transcripción global de proteínas, transformando así al complejo eIF2 en un inhibidor competitivo. A su vez propicia la traducción de ciertos factores que propician la reparación celular en condiciones de estrés [4].

Activating transcription factor 4 (ATF4)

Es una proteína formada a partir de 351 aminoácidos, forma parte de las proteínas activadas por UPR. Su expresión aumenta en células expuestas a factores de estrés tales como hipoxia, anoxia, mala nutrición, entre otras [20]. En ratas su mRNA contiene 2 uORF, tal como se muestra en la Figura 1.5. Su traducción está mediada por el factor eIF2 α , la que al estar fosforilada interrumpe la lectura de uORF2, generando la lectura de ATF4 ORF [20]. ATF4 posee varios dominios, que le permiten homo y heterodimerizarse para cumplir la función de factor de transcripción en el núcleo [20].

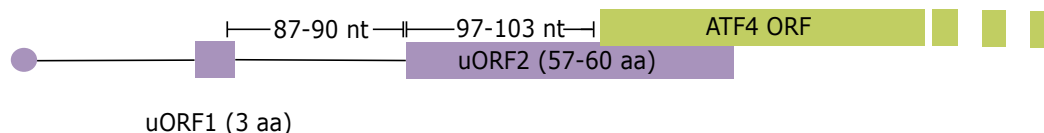


Figura 1.5: mRNA de ATF4, muestra los diferentes ORF que posee y sus tamaños. Adaptada de Richard J. Jackson et al [5].

Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)

Es una proteína soluble de aproximadamente 17kDa. Es posible encontrar esta proteína conjugada con fosfatidiletanolamina (PE) en las membranas de autofagosomas. Es conocida como un funcional marcador de autofagosomas, ya que LC3-II se adhiere a su membrana para luego ser destruida después de la fusión del autofagosoma con el lisosoma (ver Figura 1.6). Esta proteína cumple un importante rol en la formación del autofagosoma, permitiendo la elongación de la membrana y el reconocimiento de carga (proteína mal plegada previamente marcada) [7].

Proteínas ATG

Las proteínas Atg son una serie de elementos relacionados a la autofagia, la nomenclatura Atg se inventa en 2003 y es la abreviación de “autophagy-related”, el que es usado tanto para proteínas como para genes [21].

En este trabajo se estudiarán las proteínas Atg 2, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 15 y 16.

Atg 2: Proteína necesaria para la localización de Atg 18 en la estructura preautofagosomal (PAS) y la unión de esta a Atg 9. Molecularmente interactúa selectivamente y no covalentemente con fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns-3-P)[22].

Atg 4: Corresponde a una cisteín-proteasa que escinde el aminoácido del extremo carboxil terminal de pro-LC3, dejando al descubierto en aquel lugar a glicina. Este proceso es el que inicia la transformación de LC3 para su final lipidación (ver Figura 1.7) [23].

Atg 5: Forma parte de las proteínas encargadas de elongar la membrana del autofagosoma. Estructuralmente está formada por dos dominios ubiquitin-like-fold (UFDs) y una región de α -hélice (HBR). En esta última región es donde ocurre la conjugación mediante Lys130 para conformar el complejo Atg12~Atg5, fundamental para la formación de LC3-II (ver Figura 1.7) [24].

Atg 7: Corresponde a una proteína con actividad E1-like, está asociada a múltiples funciones, como diferenciación adiposa, transporte, entre otras. Gracias a su actividad E1-like, forma parte del comienzo de la cascada de activaciones que llevan a formar LC3-II. En par-

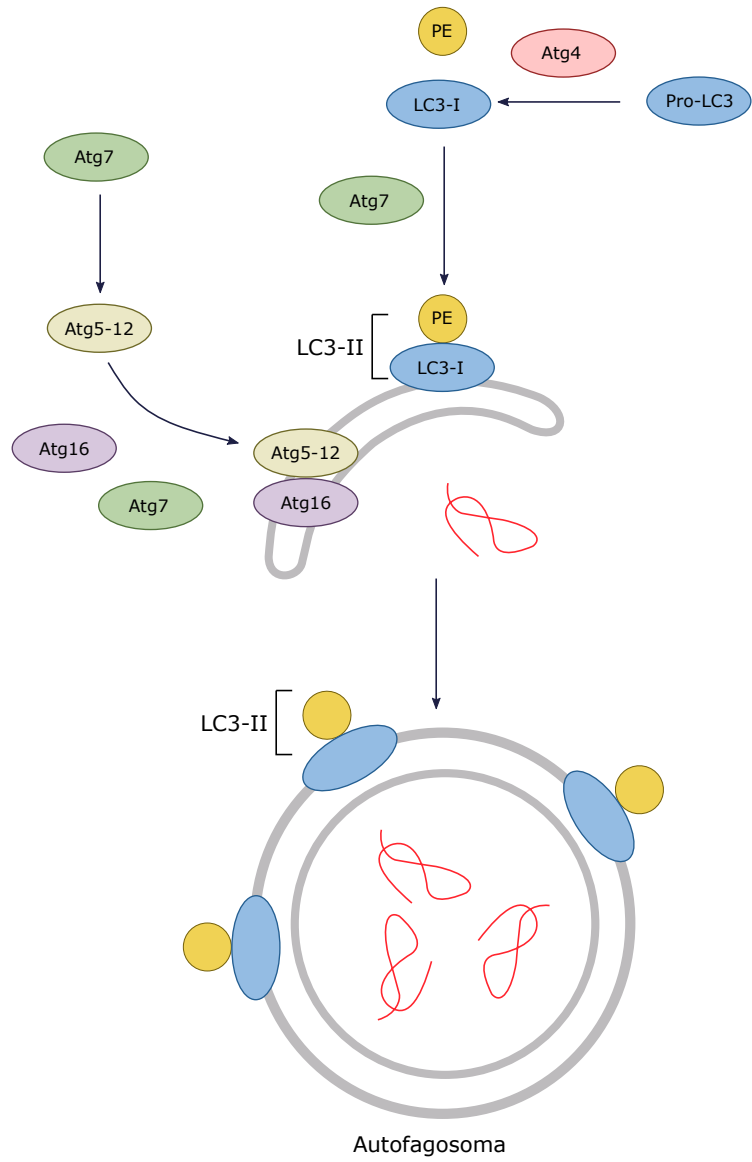


Figura 1.6: Atg4 escinde a pro-LC3 para formar LC3-I, el cual se conjuga con PE para formar LC3-II. Esta última conformación, en conjunto con algunas proteínas Atg ayudan a la elongación de la membrana del autofagosoma. Adaptada de Novus Biologicals [6].

ticular, esta proteína activa a Atg12 y LC3-I (ver Figura 1.7).

Atg 9: Es una proteína de membrana multipaso o multicanal presente en el citoplasma de las células. En condiciones normales esta transita desde Golgi hasta endosomas, sin embargo, durante déficit de nutrientes forma los llamados preautophagosomal structure (PAS) que son sitios especializados donde confluyen las proteínas atg. Se reconoce a Atg9 como la proteína encargada de suministrar las membranas lipídicas necesarias para la formación del autofagosoma. Dentro de un autofagosoma de aprox. 30–60 nm existen aprox. 30 moléculas of Atg9 [25].

Atg 10: Corresponde a una proteína con actividad E2-like que cataliza la formación del complejo Atg12~Atg5 (ver Figura 1.7) [24].

Atg 12: Forma parte de las proteínas encargadas de elongar la membrana del autofagosoma. Su forma conjugada con Atg5 y 16 es fundamental para la lipidación de LC3-I (ver Figura 1.7) [24].

Atg 16: En células animales la proteína Atg16L (en este trabajo nombrada solo como Atg16), participa en la conjugación Atg12~Atg5-Atg16 [24].

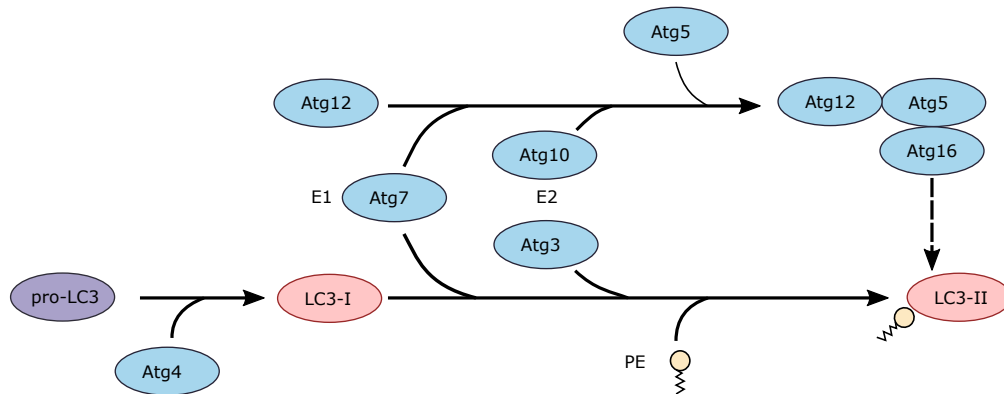


Figura 1.7: Muestra la acción de las proteínas Atg para formar LC3-II en el proceso de elongación de la membrana del autofagosoma. E1 y E2 representan la actividad E1-like y E2-like. Adaptada de Füllgrabe et al [7].

CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)

La proteína CHOP es un factor de transcripción que participa en los procesos de estrés de retículo y apoptosis [26]. Está conformado por heterodímeros, su sitio activo se presenta en su extremo N-terminal, lugar que permite su actividad de transcriptor, de esta forma permite la expresión de Bcl-2, TRIB3, entre otras importantes proteínas para degradación proteica [26].

Complejo ULK1

Unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1), es una proteína quinasa de 112 kDa. Es una proteína relevante para la formación del autofagosoma y forma parte de la primera etapa de su inducción. ULK1 forma complejo con las proteínas Atg13, Atg101 y RB1CC1.

Estructuralmente ULK1 contiene un dominio N-terminal quinasa, una región rica en serina y prolina y un dominio C-terminal que es el sitio de interacción entre ULK 1 y el resto de proteínas del complejo. Es en la región rica en prolina y serina donde la proteína es fosforilada por mTOR y AMPK. Cuando el complejo Ulk es fosforilado aumenta su actividad, permitiendo su acción sobre proteínas de nucleación como Beclin-1 (ver Figura 1.8) [7, 27].

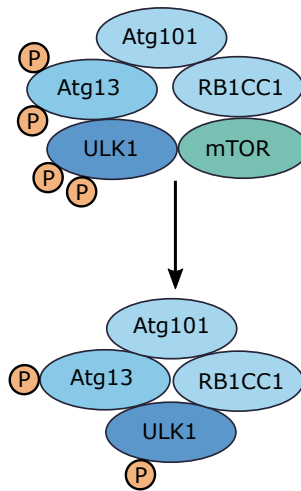


Figura 1.8: Muestra como ULK1 y Atg13 se desfosforilan luego de abandonar mTOR el complejo, aumentando de esta forma la actividad quinasa del complejo. Adaptada de Füllgrabe et al [7].

Serine/threonine-protein kinase mTOR

Esta proteína es una reguladora del metabolismo celular, crecimiento y supervivencia. Reacciona a estímulos de hormonas, factores de crecimiento, nutrientes, energía y señales de estrés [28].

mTOR está conformada por dos complejos que responden responden a estímulos distintos y reaccionan de maneras diferentes, sus nombres son mTOR complex 1 y 2 (mTORC1 y mTORC2 respectivamente) [28].

mTORC1 es el complejo encargado de regular el crecimiento celular mediante el aumento de tasas de traducción, biogénesis ribosomal y autofagia. En particular, esta ultima función requiere la activación de la subunidad RAPTOR (en mTORC1) mediante nutrientes y ami-

noácidos. En particular, la falta de nutrientes provoca la inhibición de mTORC1, lo que genera el desacople del complejo ULK1, iniciando la formación del autofagosoma (ver detalle en Figura 1.9) [7, 28].

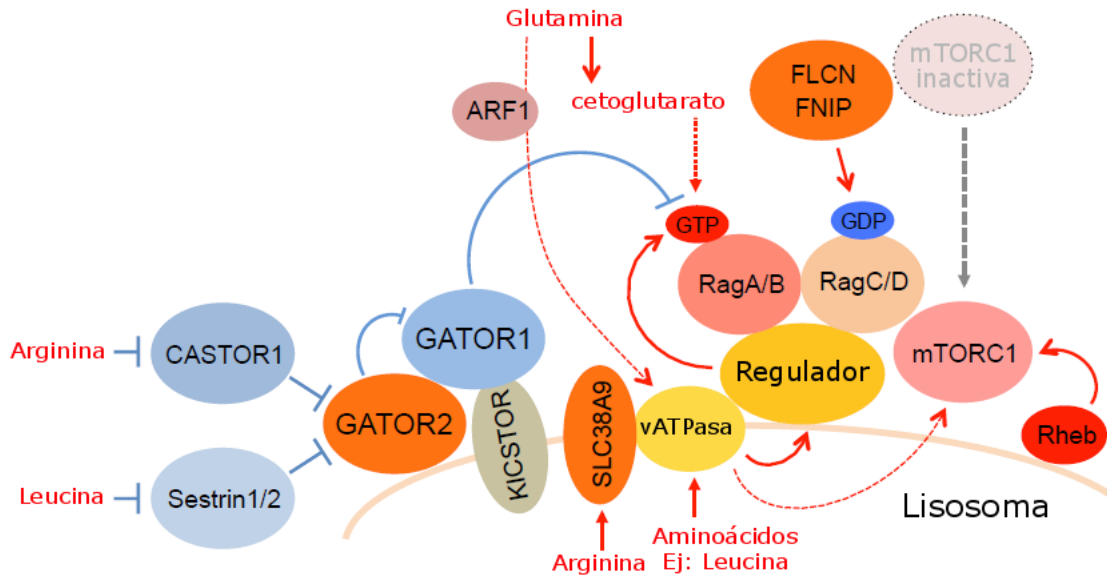


Figura 1.9: Muestra la activación de mTOR debido a la acción de los aminoácidos arginina, leucina, glutamina y α -cetoglutarato [8].

B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)

Bcl-2 es una proteína antiapoptótica presente en las cercanías de la mitocondria y el ER, estructuralmente está formada por dos α -helices hidrofóbicas rodeada de seis α -helices anfipáticas. Esta estructura permite la unión a proteínas de la familia BH3 o que poseen dominios de similares características, como Beclin 1, Bak, Bax (ver Figura 1.10) [29].

Bcl-2 homology 3 (BH3) only es una proteína proapoptótica de la familia de las Bcl-2 que posee tres dominios BH. Dada estas características es posible su unión a proteínas Bcl-2, las que poseen 4 dominios BH. De esta forma captura a Bcl-2 y en consecuencia permite la acción de Beclin 1 y el comienzo del proceso de nucleación [30].

Complejo Beclin 1

Beclin 1 es una proteína de 60 kDa de la familia BH3-only, por lo que está involucrada tanto en procesos de apoptosis como de autofagia [31]. Debido a que posee un dominio BH3 puede interactuar con proteínas Bcl-2 [31].

La proteína Beclin 1 participa en la fase de nucleación de la formación de la membrana del autofagosoma. Beclin 1 recluta proteínas claves, las que son unidas a PAS (ver Figura 1.11).

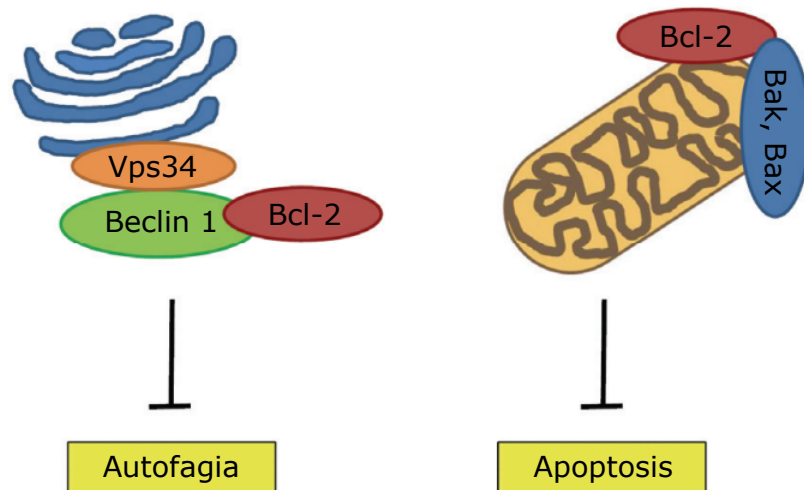


Figura 1.10: Muestra la doble acción inhibitoria de Bcl-2, tanto para la autofagia como para la apoptosis. En el caso de la autofagia al unirse con Beclin 1 previene la formación del complejo Beclin 1 y de esta forma frena el proceso de nucleación. Adaptada de Marquez et all [9].

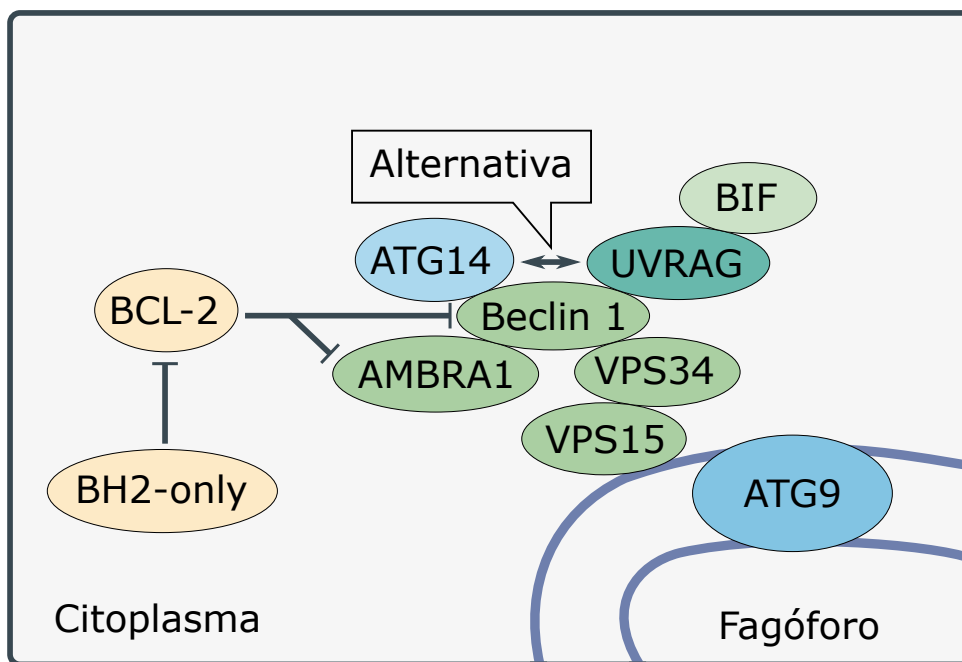


Figura 1.11: La etapa de nucleación comienza con la inhibición del inhibidor Bcl.2, en la imagen se muestra las proteínas involucradas en el complejo Beclin 1. Atg9 se muestra como el intermediario entre la fase de nucleación y recuperación. Adaptada de Füllgrabe et all [7].

PtdIns3K vacuolar protein sorting 34 (VPS34 o PIK3C3) es una proteína que forma parte del complejo que interactúa con Beclin 1. Vps34 es una proteína lípido kinasa con actividad PI3K, es decir, puede fosforilar a fosfatidilinositol (PtdIns) en la posición 3' hidroxilo. Al ser

una kinasa de clase III, produce PtdIns3P. Vps34 necesita la presencia de Vps15, el que con frecuencia es descrito como una subunidad regulatoria [32].

WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides (WIPI)

Las proteínas WIPI tienen un rol de efectores de unión específicos a PtdIns3P y proveen al fagóforo de membranas para su crecimiento. A su vez son esenciales para la lipidación de LC3, formando parte de la etapa de recuperación (ver Figura 1.12) [10].

La familia de proteínas WIPI se divide en 4, siendo WIPI 1 y 2 las participantes directas de la etapa de recuperación en la formación de la membrana del autofagosoma.

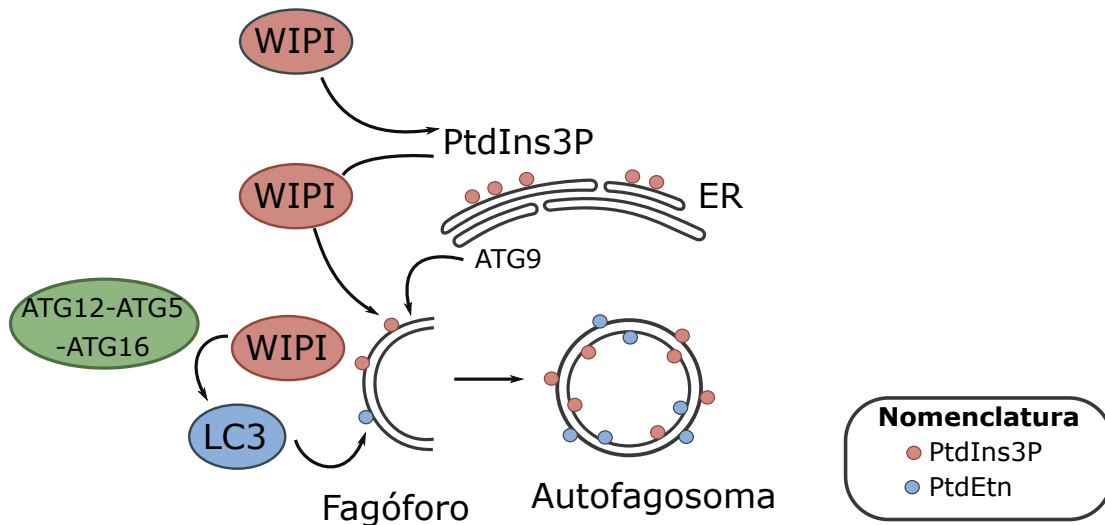


Figura 1.12: La generación de PtdIns3P mediante la acción de Vps34 permite la unión de estas a las proteínas WIPI en las cercanías del omegasoma (un subdominio del ER rico en PtdIns3P). Con ayuda de éstas moléculas y Atg9 se forma el fagóforo. Posteriormente WIPI secuestra al complejo Atg12-Atg5-Atg16 mediante la unión con Atg16, generando el acople de LC3 con PtdEtn (PE). Las proteínas WIPI también pasan a formar parte de la membrana del autofagosoma. Adaptada de Proikas et al [10].

1.5.2. Descripción del proceso

El retículo endoplasmático es el organelo en donde se sintetizan la mayoría de las proteínas, en especial las transmembrana. Si se alteran las condiciones celulares, provocando un cambio en la homeostasis, es posible causar la aglomeración de proteínas mal plegadas el lumen del retículo. Ésto genera multiples respuestas y señales, principalmente en tres niveles. Primero se busca replegar las proteínas para restaurar la homeostasis, luego degradar las proteínas mal plegadas y finalmente la apoptosis [33].

Este trabajo busca describir parte de los dos primeros niveles descritos, considerando solo los elementos nombrados en la sección anterior.

El proceso de degradación de proteína puede comenzar debido a varios estímulos, en esta ocasión se asume que el estímulo inicial es la falta de nutrientes. Esta falta de nutrientes genera déficit de aminoácidos, produciéndose de este modo proteínas mal plegadas y condiciones de inicio de formación de autofosoma.

La presencia de proteína mal plegada en el lumen del retículo induce, tal como se muestra en la Figura 1.13, la disociación del dímero transmembrana BiP-PERK. De esta forma MP actúa como activadora de la cadena de reacciones (ver Figura 1.14).

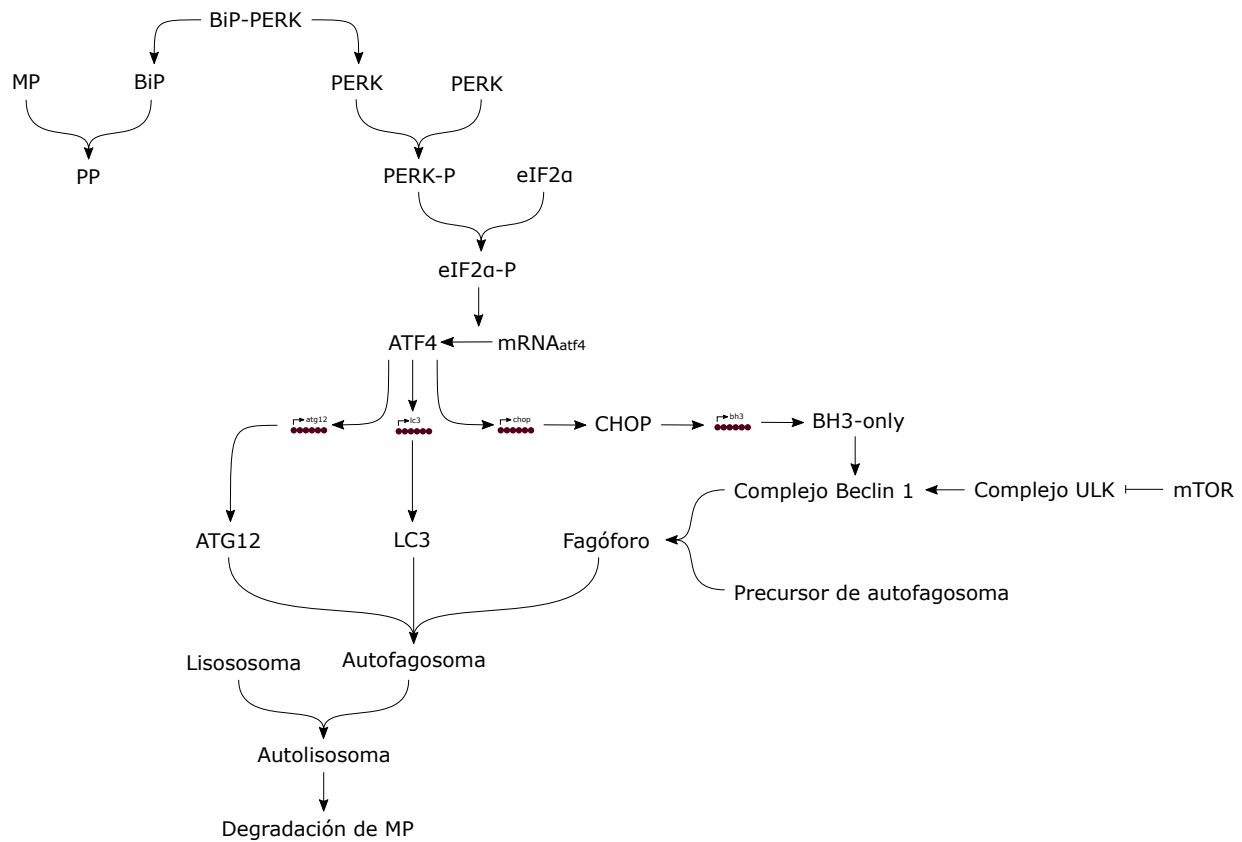


Figura 1.13: Diagrama del proceso de degradación de proteínas mal plegadas, considerando solo los elementos participantes en el modelo.

Al disociarse la proteína chaperona BiP, rápidamente se asocia a la proteína mal plegada, otorgando la posibilidad de replegarse correctamente. A su vez, la proteína PERK, orientada hacia el citosol y ahora sin la presencia de BiP, se autofosforila. Como resultado de ello el aminoácido serina 51 del factor de iniciación eIF2α es fosforilado, lo que provoca la disminución de la traducción global de mRNA, sin embargo, a su vez induce la transcripción específica de ciertos mRNAs, como por ejemplo, el del factor ATF4 (ver Figura 1.15). Ésto ocurre debido a que el extremo 5'UTR del mRNA de ATF4 posee dos uORFs. En condiciones normales, luego de la lectura de uORF1, la subunidad 40S sigue unida al mRNA, lo que permite la lectura de uORF2. Sin embargo, bajo condiciones de estrés, la fosforilación de eIF2α impide la reiniciación de la subunidad 40S en uORF2, por lo que la subunidad seguirá escaneando,

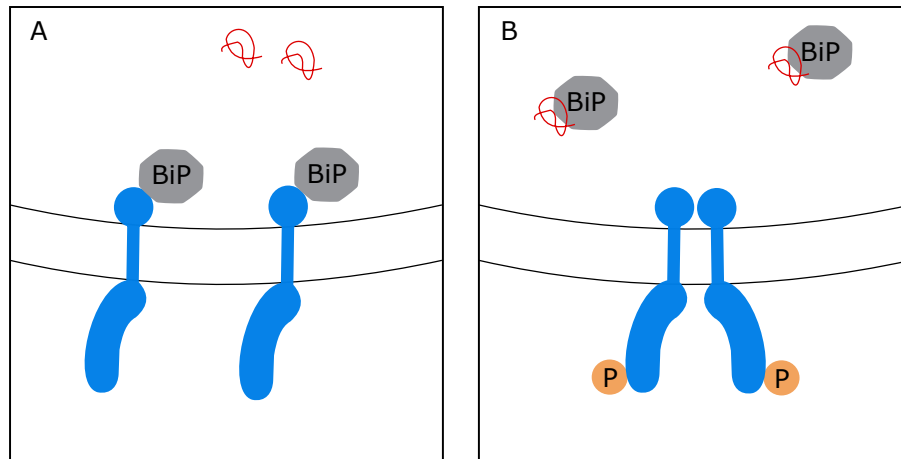


Figura 1.14: *A* muestra el dímero BiP-PERK en la membrana del ER, en rojo el estímulo de proteína mal plegada. En *B* se observa la disociación de BiP-PERK, la captura de proteína mal plegada por parte de BiP y la homodimerización de PERK junto con su autofosforilación.

permitiendo de esta forma la expresión de ATF4 (ver Figura 1.16) [34].

Luego de expresado, el factor ATF4 ingresa al núcleo regulando la transcripción de una serie de mensajeros, entre ellos CHOP, LC3 y ATG12. Este factor potencia la transcripción de los genes uniéndose al DNA desde su extremo C-terminal.

El factor CHOP, en esta red funciona como factor de transcripción de las proteínas BH3-only, regulando de este modo el proceso de nucleación de fagóforo, el que consiste en la conversión de fosfatidilinositol en fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns3K) por medio del complejo Beclin 1. Bh3-only al unirse a Bcl-2 frena su acción inhibitoria frente al complejo Beclin 1 (ver Figura 1.17) [7, 11].

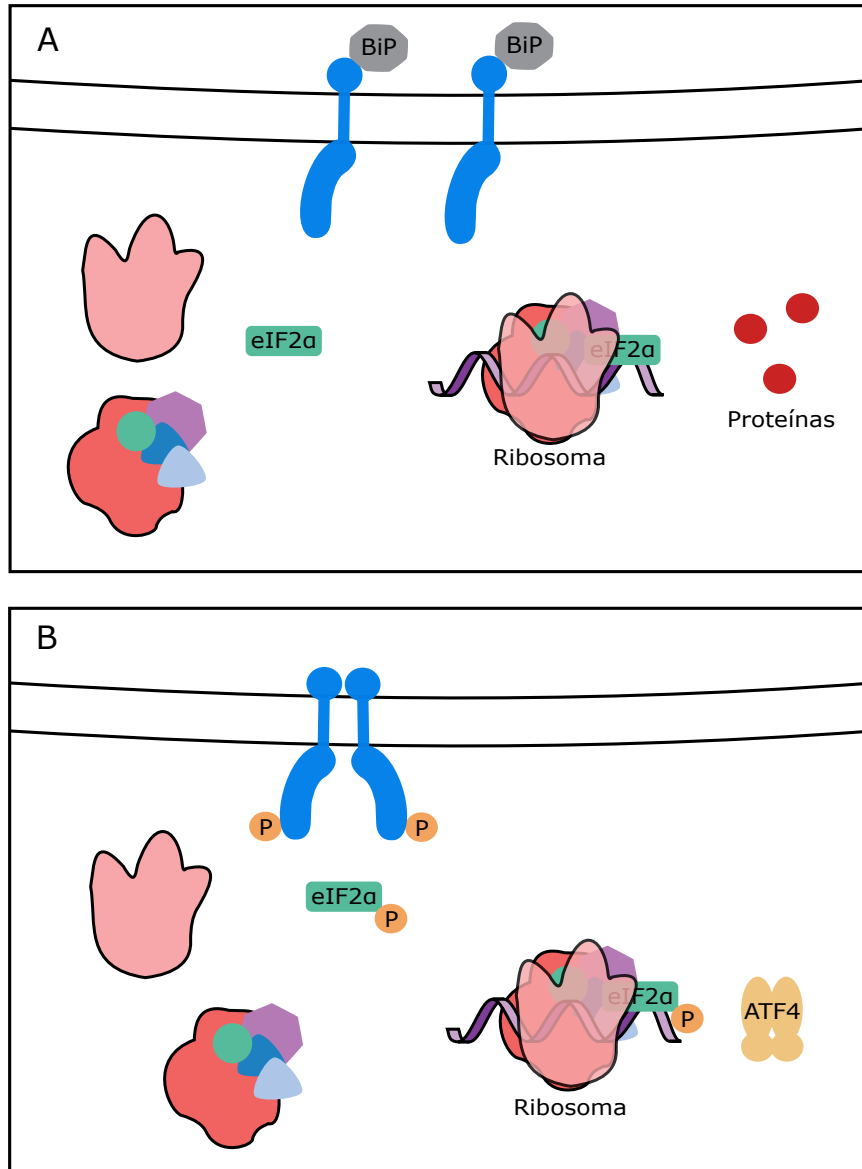


Figura 1.15: *A* muestra el funcionamiento en condiciones sin estrés, con eIF2 α desfosforilado. *B* muestra el factor eIF2 α fosforilado (en verde) por la acción de PERK (en azul) debido a que la célula se encuentra sometida a estrés. eIF2 α disminuye la traducción global de proteínas, pero se une a la subunidad 40S del ribosoma para comenzar la lectura del mRNA de ATF4.

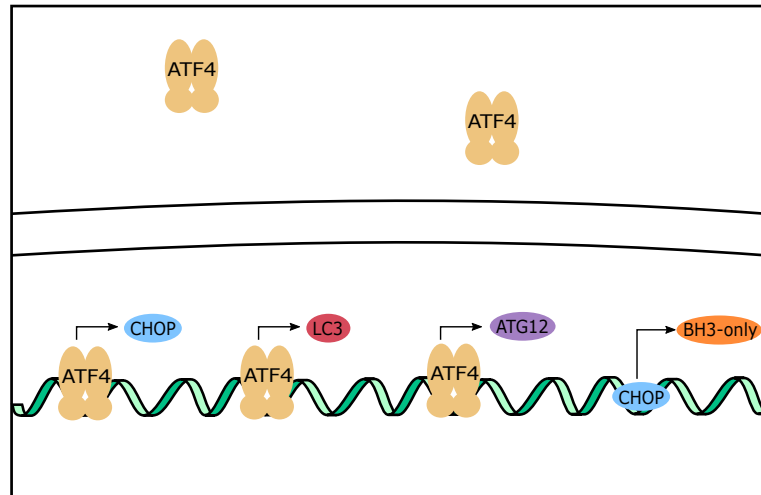


Figura 1.16: Se puede apreciar como el factor ATF4 entra al núcleo y activa la lectura de las proteínas CHOP, LC3, ATG12, entre otras. También se muestra la acción de CHOP sobre la transcripción de BH3-only.

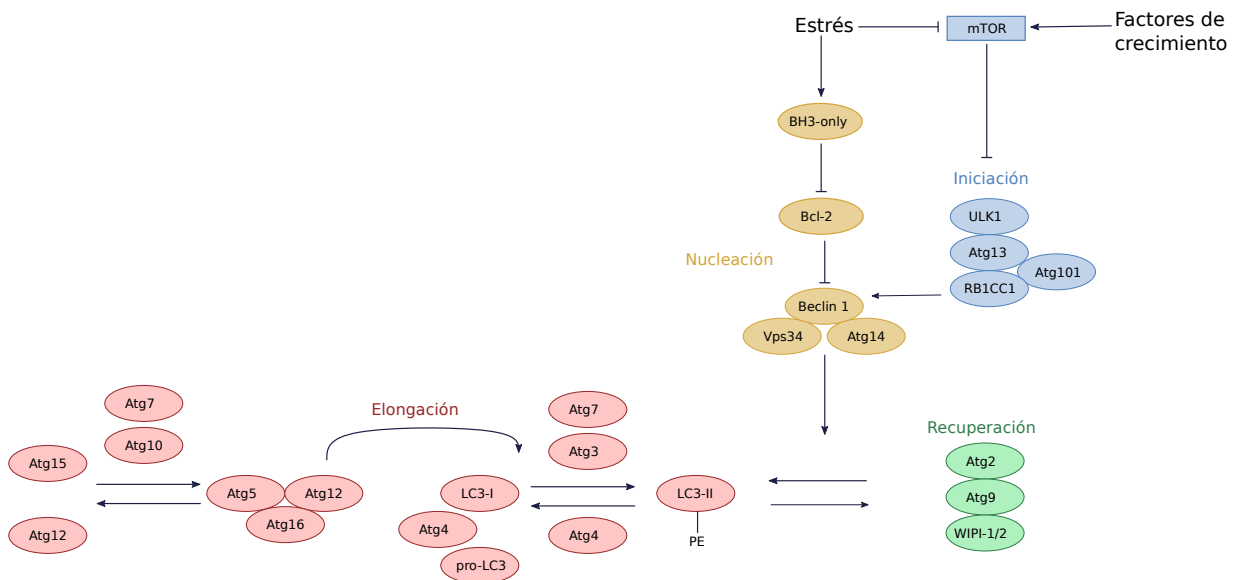


Figura 1.17: Se aprecian las 4 etapas de la formación del autofagosoma. En Azul la etapa de iniciación, en la que se encuentran los receptores de señales de estrés, como mTOR y los primeros efectores como Ulk1. En amarillo la etapa de nucleación, que corresponde a la unión de las proteínas Atg involucradas en la generación del fagóforo. En rosado se muestra la etapa de elongación, en la que se lipida LC3 por medio del complejo Atg12-Atg5-Atg16, Atg4 y la participación de proteínas WIPI. Finalmente, en verde se muestra el proceso de recuperación, que consiste en la generación de PtdIns3P, captura de las primeras membranas, participación en lipidación de LC3 al formar PE a partir de PtdIns3P y la finalización de la membrana a partir de la acción de Atg9 y LC3. Adaptada de Mehrpour et al [11].

La Producción de PtdIns3P genera el acople de ciertas proteínas relevantes, como el complejo Atg12-Atg5-Atg16, debido a esto permite la curvatura de la membrana, dando la característica de bicapa lipídica (ver Figura 1.18) .

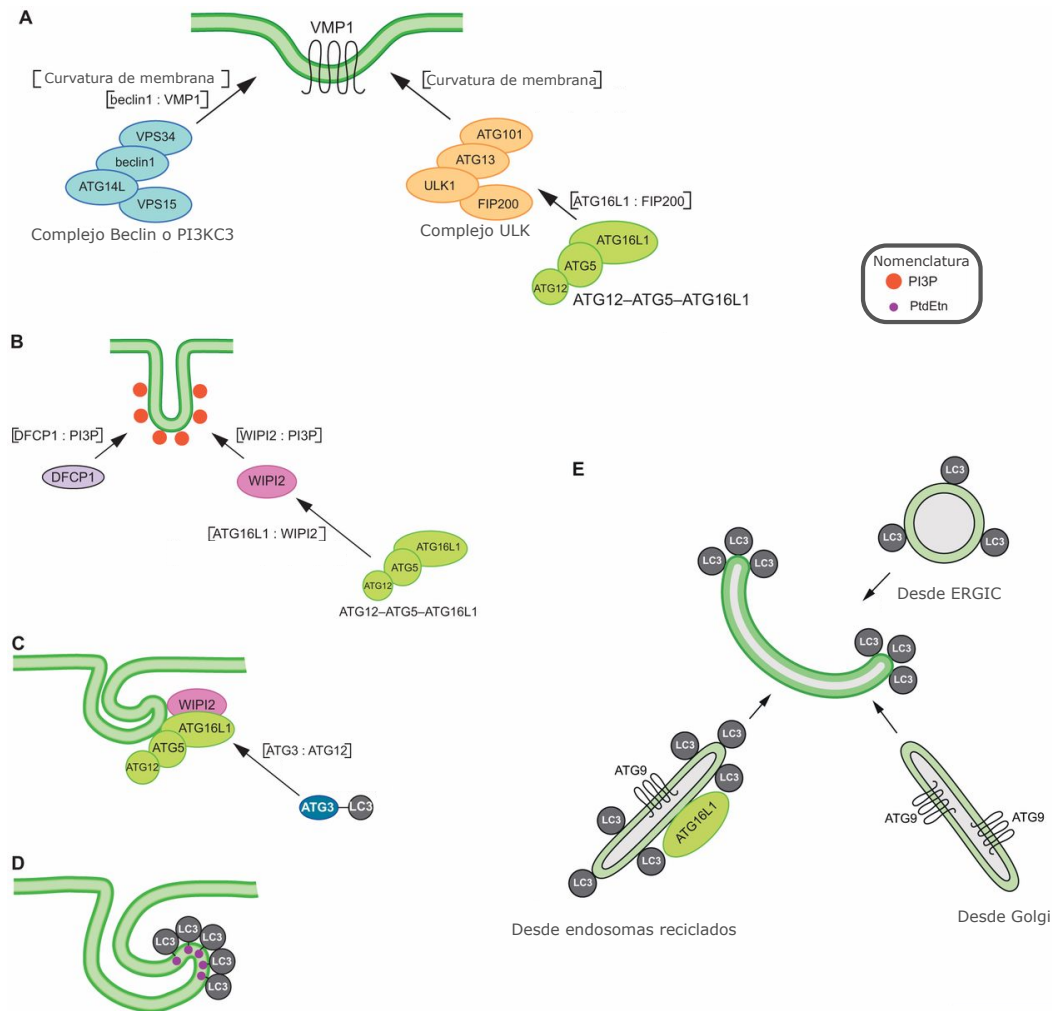


Figura 1.18: Muestra el inicio del proceso de formación de la membrana del autofagosoma. El complejo Beclin es el encargado de activar a PtdIns3P, el que se ancla en los alrededores de la proteína transmembrana VMP1. Este lípido es fundamental para el acople de LC3 a la membrana, funcionando como señal de unión de una serie de proteínas, por ejemplo WIPI. Posteriormente de la formación de esta estructura, Atg9 es el encargado de administrar lípidos al formar vesículas de transporte [12].

Por otra parte, la carencia de aminoácidos, especialmente de lisina, provoca la inhibición de mTOR, un inhibidor de la formación de autofagosoma y participante de la iniciación de ese proceso (ver Figura 1.17). Esto genera que Ulk1 se desfosfore, aumentando su actividad y permitiendo su acción sobre Beclin1, afectando positivamente el proceso de nucleación. Esta etapa está íntimamente ligada con la de recuperación, siendo Atg9 un elemento clave, funcionando como conector de ambos procesos. Atg9 es el encargado de suministrar las membranas necesarias para la formación del autofagosoma, las que pueden provenir del ER

omegasoma, aparato de Golgi, sitios de contacto ER-mitocondria, endosomas o membrana plasmática [25, 35].

Con el fagóforo formado se procede a la elongación de la incipiente membrana, en este paso el elemento clave es LC3, el que debe ser activado, en primera instancia por la escisión de su aminoácido C-terminal por acción de Atg4 para conformar Lc3-I y en segunda instancia por la lipidación de LC3-I por medio de Atg3, 7 y el complejo Atg12~Atg5-Atg16. En esta etapa es donde LC3, funciona como receptor de proteínas ancladas a las proteínas mal plegadas, por lo que es el que reconoce y secuestra a las proteínas dentro del autofagosoma.

Las proteínas Atg9 y WIPI, partes de la fase de recuperación, terminan de formar el autofagosoma. Estas son las encargadas de llevar los lípidos necesarios para la formación de la membrana. Atg9 es la que reconoce las membranas en el citoplasma y las desplaza al complejo de nucleación, el que es reconocido por la proteína WIPI debido a la presencia de PtdIns3P.

Finalmente, luego de la formación del autofagosoma las proteínas atg se liberan al citoplasma para ser reutilizadas, a su vez el autofagosoma maduro se fusiona con lisosoma para conformar el autolisosoma. De esta manera las proteínas mal plegadas pueden ser destruidas al interior del autolisosoma por medio de las enzimas provenientes del lisosoma.

Capítulo 2

Metodología

2.0.1. Herramientas utilizadas

Para la resolución del sistema de ecuaciones y la visualización de gráficos se utiliza el software Matlab[®]. El método de resolución implementado es ODE45.

2.0.2. Descripción del procedimiento

Para obtener los resultados que se requieren se deben realizar una serie de pasos, los que se pueden apreciar en la Figura 2.1.

En primer lugar se procede a realizar una búsqueda bibliográfica del proceso a abordar. En esta etapa se busca interiorizar en los fenómenos relativos a las rutas estudiadas, así como analizar el contexto económico, abundancia o escasez de información, información específica de cada proteína, entre otras.

Con la información disponible se procede a analizar cada una de las proteínas estudiadas, con el fin de determinar el rol que juegan en el proceso y así poder discriminar entre los elementos que serán incluidos y los que no en el modelo.

Considerando lo anterior, se plantean las reacciones e interacciones que tienen los componentes entre si. Conjuntamente y basándose en ellas se formulan las ecuaciones que describan las interacciones previamente dichas.

Teniendo las ecuaciones planteadas, se procede a identificar variables y parámetros. Se realiza una búsqueda bibliográfica con el objetivo de encontrar los valores de los parámetros, si los ellos no son encontrados se aproximan siguiendo criterios especificados en las secciones correspondientes. En la simulación los parámetros son ajustados con el fin de describir los fenómenos biológicos.

El modelo se divide en subsistemas, los que son simulados con el objetivo de analizar la

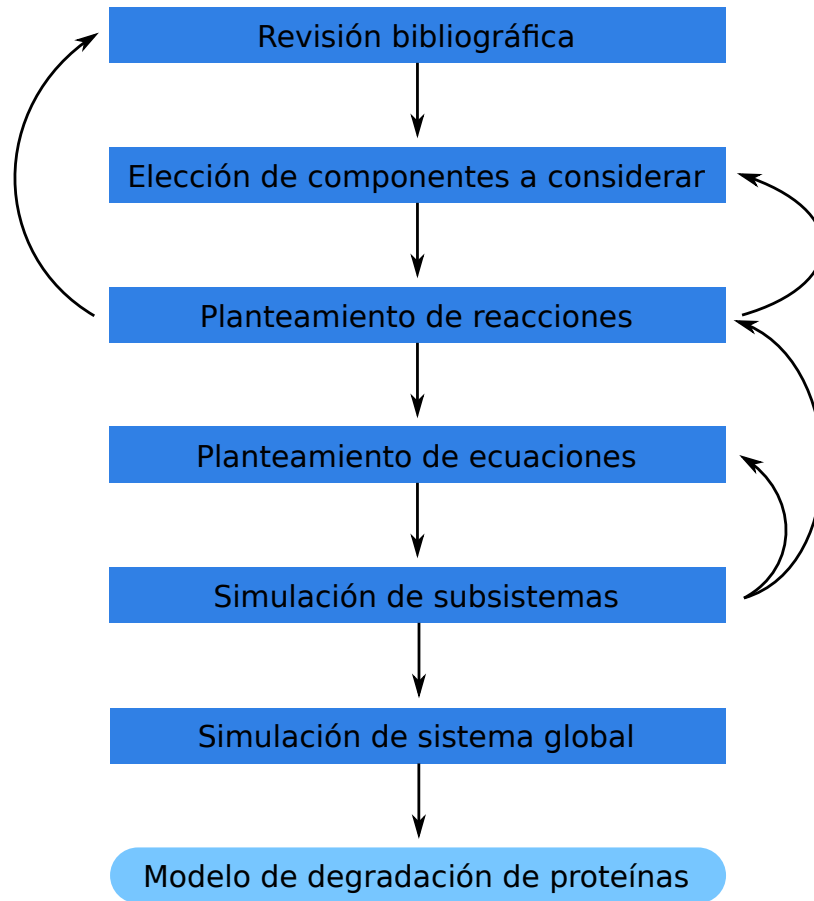


Figura 2.1: Esquema del trabajo realizado, se muestran los pasos seguidos para la obtención del modelo de degradación de proteínas.

dinámica de las interacciones. Posteriormente se realiza una simulación global de todas las interacciones a la vez y se analizan los resultados de manera análoga. De esta forma se obtiene un modelo inicial para la degradación de proteínas vía autolisosoma.

Capítulo 3

Resultados y discusiones

3.1. Modelo

3.1.1. Consideraciones preliminares

Elementos del modelo y sus abreviaciones

Las ecuaciones que describirán el modelo planteado se basan en las reacciones e interacciones que realizan las diferentes proteínas y elementos considerados. Estas interacciones se describen con detalle en el Anexo A.1.

Para facilitar la lectura se utilizarán abreviaciones de los componentes de la red analizada. Estas se pueden observar en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Abreviación de los elementos participantes en las ecuaciones del modelo.

Tabla de abreviaciones	
Abreviación	Nombre del elemento
A10	Atg10
A12	Atg12
a12	$mRNA_{Atg12}$
A12A10	Atg12-Atg10
A12A5	Atg12-Atg5
A12A5A16	Atg12-Atg5-Atg16
A12A7	Atg12-Atg7-Atg7
A16	Atg16
A3	Atg3
A4	Atg4
A5	Atg5
Sigue a continuación	

Tabla 3.1: Abreviación de los elementos participantes en las ecuaciones del modelo (continuación)

Tabla de abreviaciones (cont.)	
Abreviación	Nombre del elemento
A7	Atg7-Atg7
A9	Atg9
AF4	ATF4
Al	Autolisosoma
Atf	Autofagosoma
B	BiP
Bcl	Bcl-2
BE	Beclin complex
BE_p	Beclin complex-P
BEBcl	Beclin complex-Bcl-2
BH	BH3-only
bh	$mRNA_{BH3-only}$
BHBcl	Bh3-only-Bcl-2
BMP	BiP-Proteína mal plegada
BP	BiP-PERK
C	CHOP
c	$mRNA_{CHOP}$
e	eIF2alpha
e_p	eIF2alpha-P
eP_p	eIF2alpha-P-PERK-PERK-P
L	Lípidos y otras proteínas de membrana en vesículas post Golgi
L^*	Lípidos y otras proteínas de membrana en omegasoma
LA9	Lípidos y otras proteínas-Atg9
$LC3^*$	LC3-II-PE-MP
LI	LC3-I
LIA3	LC3-I-Atg3
LIA7	LC3-I-Atg7-Atg7
LIPE	LC3-II-PE
Lis	Lisosoma
MP	Proteína mal plegada
P	PERK
P_p	P-PERK-PERK-P
PE	PE
pL	proLC3
pLA4	proLC3-Atg4
pl	$mRNA_{proLC3}$
PP	Proteína correctamente plegada
Sigue a continuación	

Tabla 3.1: Abreviación de los elementos participantes en las ecuaciones del modelo (continuación)

Tabla de abreviaciones (cont.)	
Abreviación	Nombre del elemento
Ptd	PtdIns
Ptd_{3p}	PtdIns3P
$PtdBE_p$	PtdIns-Beclin complex-P
U	ULK1 complex
U_p	ULK1 complex-P
UBE	ULK1 complex-Beclin complex

Síntesis y degradación de proteínas

Con el objetivo de disminuir las variables en el análisis del modelo no se considerarán los valores referentes a tasa de síntesis y degradación. Esta consideración se tendrá sobre las proteínas y lípidos que, dentro de los límites de este modelo, no son regulados mediante transcripción ni traducción. Los componentes regulados, por otra parte, tendrán asociados valores de síntesis. Estos elementos son los siguientes:

- Atg12
- proLC3
- CHOP
- BH3-only

Este supuesto genera que al largo plazo las proteínas descritas se acumulen, ya que existiría síntesis y no degradación. Debido a esto y a que en el largo plazo pueden existir otros mecanismos y regulaciones involucrados, el modelo solo es válido para un período fijo de tiempo, el que se evaluará según las simulaciones a realizar.

Además se considera la degradación final del autolisosoma, con el fin de observar la degradación de proteína por este medio.

Crecimiento celular

El espacio donde ocurren las interacciones y reacciones entre los diferentes elementos de la red es una célula animal. Las expresiones de las ecuaciones serán de concentraciones dentro de dicha célula. Por lo que no se evaluará el efecto de dilución asociado al crecimiento celular en el sistema.

Constantes cinéticas

Las constantes cinéticas se denotarán con la letra k . Dependiendo de su subíndice se podrá identificar la reacción o interacción a la que está vinculada y el producto al que está asociado. Los subíndices del primer par ordenado son los siguientes:

- as: Asociación
- d: Degradación
- des: Desfosforilación
- di: Disociación
- es: Escisión
- fc: Formación
- fos: Fosforilación
- p: Plegamiento
- su: Sustitución
- td: Traducción
- tc: Transcripción
- tp: Transporte

Un ejemplo de aplicación es $k_{di,BMP}$, que representa la constante cinética asociada a la disociación del complejo BMP.

3.1.2. Ecuaciones

A continuación se presentan las ecuaciones que describen el comportamiento de cada uno de los componentes variables del modelo, para más detalle sobre la deducción de las expresiones y las reacciones en las que están involucradas ver Anexos A.1 y A.2.

En el Anexo C se muestra un diagrama simplificado del proceso, el que resulta útil para comprender las relaciones que se establecen entre los distintos componentes. Partes de este diagrama serán presentados en esta sección, con el fin de simplificar la comprensión de las ecuaciones.

Reconocimiento de proteína mal plegada

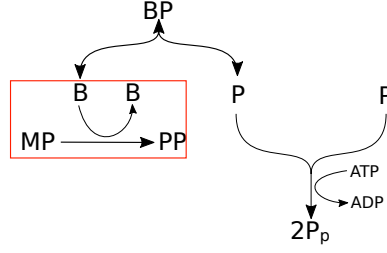


Figura 3.1: Sección de reconocimiento de proteína mal plegada.

Proteína correctamente plegada (PP) La concentración de proteína plegada correctamente depende directamente de la acción de la chaperona BiP sobre la proteína mal plegada. Debido a que esta reacción se considera irreversible, la concentración de PP no afecta a la dinámica del problema y se considera inicialmente como 0 (ver Ecuación 3.2).

$$\frac{d[PP]}{dt} = k_{p,PP}[BMP] \quad (3.1)$$

Proteína mal plegada (MP) La concentración de proteína mal plegada disminuye al asociarse a BiP y LIPE, pero a su vez aumenta al disociarse de su unión reversible con BiP. Por otra parte, se considera la producción de proteína mal plegada debido a la acción de $eIF2\alpha$ en el ribosoma (ver Ecuación 3.2).

$$\frac{d[MP]}{dt} = -k_{as,BMP}[B][MP] + k_{di,BMP}[BMP] + k_{td,MP}[e] - k_{as,LC3^*}[LIPE][MP] \quad (3.2)$$

BiP La concentración de BiP aumenta de forma directa por la disociación de los complejos BMP y BP, pero disminuye por sus respectivas asociaciones (ver Ecuación 3.3).

$$\frac{d[B]}{dt} = k_{di,BP}[BP] - k_{as,BP}[B][P] + k_{di,BMP}[BMP] - k_{as,BMP}[B][MP] + k_{p,PP}[BMP] \quad (3.3)$$

Complejo BiP-MP La concentración del complejo que forma BiP con la proteína mal plegada depende tanto de los factores de asociación y disociación como de la formación de proteína correctamente plegada, de esta forma se deduce la Ecuación 3.4.

$$\frac{d[BMP]}{dt} = -k_{di,BMP}[BMP] - k_{p,PP}[BMP] + k_{as,BMP}[B][MP] \quad (3.4)$$

A su vez, se puede inferir (ver Anexo A.2) una relación entre este complejo y la cantidad de BiP total, proteína mal plegada y una constante de velocidad definida como K_B (ver Ecuación A.6).

$$V_{BMP} = \frac{(V_{max}^B)(MP)}{K_B + (MP)} \quad (3.5)$$

Homodimerización y fosforilación de PERK

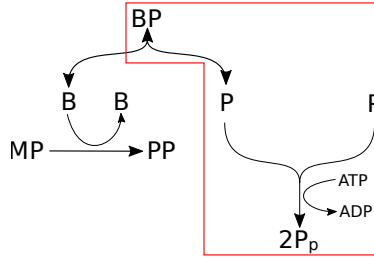


Figura 3.2: Sección de homodimerización y fosforilación de PERK.

PERK La proteína PERK realiza una homodimerización y autofosforilación, es por esto que posee una dependencia cuadrática en estos procesos. Su concentración depende tanto de los procesos de asociación y disociación con BiP como de su fosforilación y desfosforilación (ver Ecuación 3.6).

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{des,P}[P_p]^2 - k_{fos,P}[P]^2 - k_{as,BP}[B][P] + k_{di,BP}[BP] \quad (3.6)$$

Complejo BiP-PERK El complejo BiP-PERK es fundamental para el reconocimiento de proteínas mal plegadas, su concentración varía solo dependiendo de su formación y disociación (ver Ecuación 3.7).

$$\frac{d[BP]}{dt} = -k_{di,BP}[BP] + k_{as,BP}[B][P] \quad (3.7)$$

Entre la formación y disociación del complejo es posible establecer una relación de equilibrio, definida mediante la siguiente ecuación:

$$k_{eq,BP} = \frac{[BP]}{[B][P]} \quad (3.8)$$

PERK fosforilado PERK en su forma fosforilada cumple con el rol de kinasa frente a $eIF2\alpha$, por lo que su concentración libre depende tanto de la fosforilación y desfosforilación de este factor, como de su propia fosforilación (ver Ecuación A.8).

$$\frac{d[P_p]}{dt} = k_{fos,P}[P]^2 - k_{des,P}[P_p]^2 - k_{as,eP_p}[P_p][e] + k_{di,eP_p}[eP_p] + k_{fos,e_p}[eP_p] \quad (3.9)$$

Fosforilación del factor eIF2 α

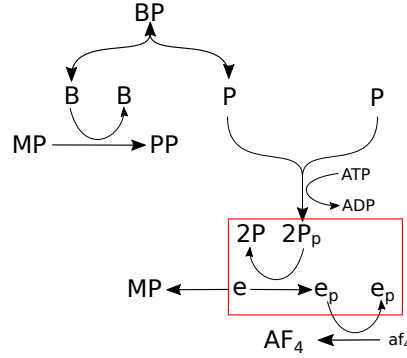


Figura 3.3: Sección de fosforilación del factor eIF2 α .

eIF2 α Es un factor que participa en la traducción global de proteínas. Su forma fosforilada permite la expresión del factor ATF4. La concentración de este factor aumenta al desacoplarse de su forma conjugada y disminuye asociarse a PERK-P. Debido a los supuestos tomados en el anexo de reacciones (Anexo A.1, Reacción A.5), la concentración de este componente no cambia debido a su acción sobre la traducción de proteína mal plegada (ver Ecuación 3.10).

$$\frac{d[e]}{dt} = k_{di,eP_p}[eP_p] - k_{as,eP_p}[e][P_p] \quad (3.10)$$

Complejo eIF2 α -PERK-P Este complejo intermediario para la fosforilación del factor eIF2 α se forma por la asociación del factor y PERK-P. Al ser esta interacción reversible, la concentración disminuye al completar la disociación del complejo (ver Ecuación 3.11).

$$\frac{d[eP_p]}{dt} = -k_{di,eP_p}[eP_p] + k_{as,eP_p}[e][P_p] - k_{fos,e_p}[eP_p] \quad (3.11)$$

A su vez, de forma análoga a lo ocurrido con el complejo BiP-MP (ver Anexo A.2), se establece una relación entre la concentración del complejo y la cantidad de PERK total, eIF2 α y una constante de velocidad definida como K_{P_p} (ver Ecuación A.8).

$$V_{eP_p} = \frac{(V_{max}^{P_p})(e)}{K_{P_p} + (e)} \quad (3.12)$$

eIF2 α fosforilado Este factor en su forma fosforilada inhibe la traducción global de proteínas, sin embargo, promueve la traducción del factor ATF4. La concentración de eIF2 α –

P aumenta al fosforilarse desde el complejo que forma con PERK. En este caso no se considera su desfosforilación, limitando el tiempo en que el modelo es aplicable.

$$\frac{d[e_p]}{dt} = k_{fos,e_p}[eP_p] \quad (3.13)$$

Producción de ATF4 y regulación de traducción

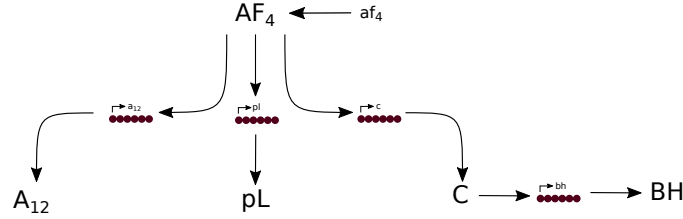


Figura 3.4: Sección de producción de ATF4 y regulación de traducción.

ATF4 El factor ATF4 es producido mediante la acción de $eIF2\alpha$ fosforilado. En este modelo se asume que existe siempre $mRNA_{atf4}$ disponible para su traducción. De esta forma su producción se describe en la Ecuación 3.14.

$$\frac{d[AF4]}{dt} = k_{td,AF4}[e_p] \quad (3.14)$$

$mRNA_{Atg12}$ La velocidad de transcripción del mensajero de Atg12 está dada por la concentración del factor que estimula su producción (ver deducción en Anexo A.2). Donde K_d se define como la relación de equilibrio entre la asociación y disociación de la unión formada por el promotor y el sitio de unión del ADN (ver Ecuación 3.15).

$$\frac{d[a12]}{dt} = \beta_{a12} \frac{AF4}{K_{d,a12} + AF4} \quad (3.15)$$

Atg12 Atg12 es un factor relevante en el proceso de lipidación de LC3. Participa en la generación de complejos con Atg7, Atg10, Atg5 y Atg16. En este modelo se considera además su velocidad de traducción (ver Ecuación 3.16).

$$\frac{d[A12]}{dt} = k_{di,A12A7}[A12A7] - k_{as,A12A7}[A12][A7] + k_{td,A12}[a12] \quad (3.16)$$

$mRNA_{CHOP}$ La velocidad de transcripción del mensajero de CHOP está determinada de forma análoga que el caso de $mRNA_{atg12}$. Depende de la concentración de ATF4 (ver Ecuación 3.17).

$$\frac{d[c]}{dt} = \beta_c \frac{AF4}{K_{d,c} + AF4} \quad (3.17)$$

CHOP CHOP cumple variadas funciones celulares, en esta ocasión se estudia su función como factor de transcripción de BH3-only, un activador de la fase de nucleación de la formación de membrana del autofagosoma. En este modelo no se estudian otras posibles interacciones de CHOP, por lo que su dinámica solo está asociada a su producción (ver Ecuación 3.18).

$$\frac{d[C]}{dt} = k_{td,C}[c] \quad (3.18)$$

mRNA_{BH3-only} La velocidad de transcripción del mensajero de BH3-only está determinada de forma análoga que en los casos anteriores, sin embargo, el factor que induce la producción de este RNA es CHOP (ver Ecuación 3.19).

$$\frac{d[bh]}{dt} = \beta_{bh} \frac{C}{K_{d,bh} + C} \quad (3.19)$$

BH3-only La concentración de BH3-only está ligada a su acción de inhibición de Bcl-2 y a la traducción de su mensajero, de esta forma es posible representar estas interacciones mediante la Ecuación 3.30.

$$\frac{d[BH]}{dt} = k_{di,BHBcl}[BHBcl] - k_{as,BHBcl}[BH][Bcl] + k_{td,BH}[bh] \quad (3.20)$$

mRNA_{proLC3} De manera análoga a los casos de Atg12 y CHOP, la velocidad de transcripción del mensajero de proLC3 está determinada por la concentración de ATF4 (ver Ecuación 3.21).

$$\frac{d[pl]}{dt} = \beta_{pl} \frac{AF4}{K_{d,pl} + AF4} \quad (3.21)$$

proLC3 proLC3 es una proteína no activada que posteriormente será transformada en LC3. Su concentración depende de la traducción de su mRNA y de la concentración de Atg4, la que escindiré a proLC3 (ver Ecuación 3.22).

$$\frac{d[pL]}{dt} = -k_{as,pLA4}[pL][A4] + k_{di,pLA4}[pLA4] + k_{td,pL}[pl] \quad (3.22)$$

Fase de nucleación en la formación de la membrana del autofagosoma

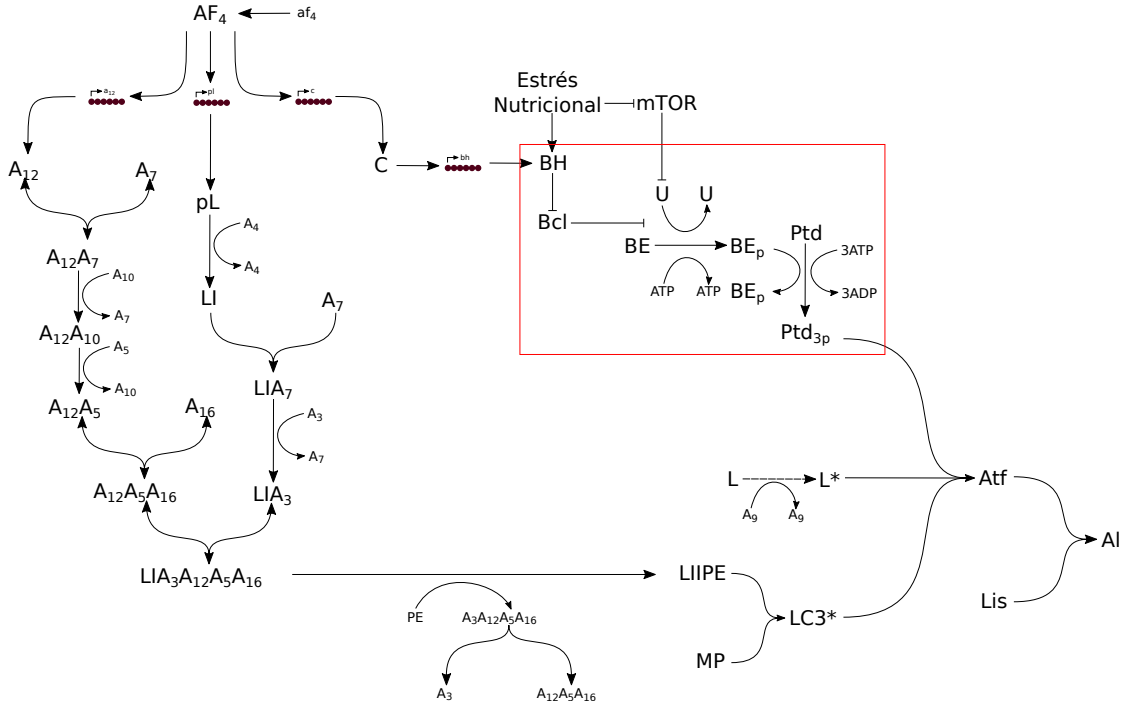


Figura 3.6: Sección de nucleación en la formación de la membrana del autofagosoma.

Complejo Beclin El complejo Beclin, en particular la proteína VPS34, participa en la activación del lípido PtdIns. Esto lo realiza mediante su fosforilación, la que se asume como de dinámica Michaeliana. Por otra parte, este complejo se ve activado por ULK1 e inhibido por Bcl-2 (ver Ecuación 3.24).

$$\begin{aligned} \frac{d[BE]}{dt} &= k_{di,UBE}[UBE] - k_{as,UBE}[U][BE] + k_{fos,BE_p}[UBE] \\ &= +k_{di,BEBcl}[BEBcl] - k_{as,BEBcl}[BE][Bcl] \end{aligned} \quad (3.24)$$

Complejo ULK1-Beclin El complejo está formado por la asociación de ULK1 y Beclin, la ecuación de velocidad de formación está dada por la velocidad de asociación, disociación y formación del producto. A su vez se deduce la relación de concentración del complejo en estado estacionario (ver Ecuaciones 3.25 y A.9).

$$\frac{d[UBE]}{dt} = -k_{di,UBE}[UBE] + k_{as,UBE}[U][BE] - k_{fos,BE_p}[UBE] \quad (3.25)$$

$$V_{UBE} = \frac{(V_{max}^U)(BE)}{K_U + (BE)} \quad (3.26)$$

Complejo Beclin fosforilado Es la forma activa de Beclin. Su concentración depende de su asociación a PtdIns y de la velocidad de fosforilación de la proteína (ver Ecuación 3.27)

$$\frac{d[BE_p]}{dt} = k_{fos, BE_p}[UBE] + k_{di, PtdBE_p}[PtdBE_p] - k_{as, PtdBE_p}[Ptd][BE_p] + k_{fos, Ptd3p}[PtdBE_p] \quad (3.27)$$

Bcl-2 Es un inhibidor del complejo Beclin, responsable de la conformación del complejo de nucleación. Su concentración depende de su unión a BH3-only y a Beclin (ver Ecuación 3.28).

$$\frac{d[Bcl]}{dt} = k_{di, BEBcl}[BEBcl] - k_{as, BEBcl}[BE][Bcl] + k_{di, BHBcl}[BHBcl] - k_{as, BHBcl}[BH][Bcl] \quad (3.28)$$

Complejo Beclin-Bcl-2 Este importante complejo forma parte de los procesos de regulación del modelo. Al establecerse esta relación, el complejo Beclin no puede activarse, por lo que la formación del autofagosoma queda inhibida (ver Ecuación 3.29).

$$\frac{d[BEBcl]}{dt} = -k_{di, BEBcl}[BEBcl] + k_{as, BEBcl}[BE][Bcl] \quad (3.29)$$

Complejo BH3-only-Bcl-2 Este complejo es el resultado de la inhibición del inhibidor Bcl-2. La concentración del complejo depende solo del equilibrio entre la formación y disociación de este (ver Ecuación).

$$\frac{d[BHBcl]}{dt} = -k_{di, BHBcl}[BHBcl] + k_{as, BHBcl}[BH][Bcl] \quad (3.30)$$

PtdIns PtdIns es la forma inactiva del lípido PtdIns3P. Su cinética se representa mediante el equilibrio entre su forma compleja y unitaria (ver Ecuación 3.31).

$$\frac{d[Ptd]}{dt} = k_{di, PtdBE_p}[PtdBE_p] - k_{as, PtdBE_p}[Ptd][BE_p] \quad (3.31)$$

Complejo PtdIns-Beclin-P La concentración de este complejo se modela mediante la expresión expuesta en la Ecuación.

$$\frac{PtdBE_p}{dt} = -k_{di, PtdBE_p}[PtdBE_p] + k_{as, PtdBE_p}[Ptd][BE_p] - k_{fos, Ptd3p}[PtdBE_p] \quad (3.32)$$

Además, tal como se observa en el Anexo A.2. Es posible simbolizar la concentración del complejo mediante la siguiente Ecuación:

$$V_{PtdBE_p} = \frac{(V_{max}^{BE_p})(Ptd)}{K_{BE_p} + (Ptd)} \quad (3.33)$$

PtdIns3P Participa de forma indirecta en la captura de LC3 en la membrana. Esto se representa mediante la incorporación de la variable en la formación del autofagosoma (ver Ecuación 3.34)

$$\frac{d[Ptd_{3p}]}{dt} = k_{fos,Ptd_{3p}}[PtdBE_p] - k_{fc,atf}[LC3^*][Ptd_{3p}][L^*] \quad (3.34)$$

Producción del complejo Atg12-Atg5-Atg16

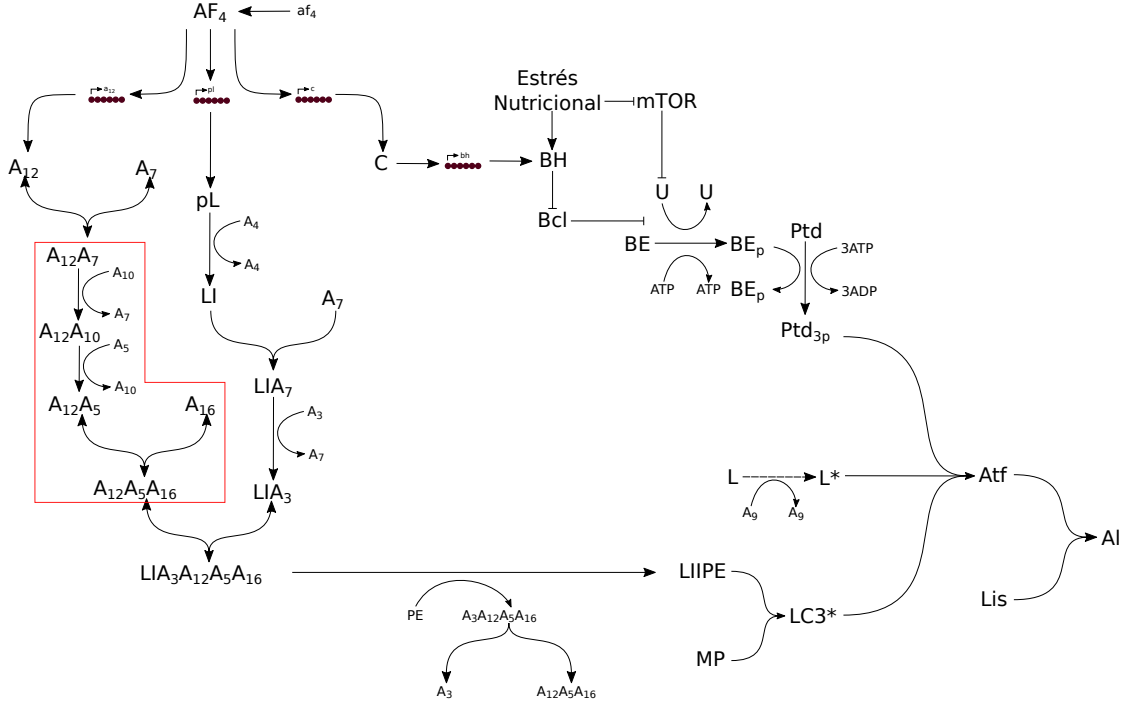


Figura 3.7: Sección de producción del complejo Atg12-Atg5-Atg16.

Las ecuaciones siguientes simbolizan la generación del complejo Atg12-Atg5-Atg16 y todos los pasos que son necesarios para conseguirlo (detalles en Anexo A.1).

$$\frac{d[A7]}{dt} = -k_{as,A12A7}[A12][A7] + k_{su,A12A10}[A12A7][A10] - k_{as,LIA7}[LI][A7] + k_{su,LIA3}[LIA7][A3] \quad (3.35)$$

$$\frac{d[A12A7]}{dt} = k_{as,A12A7}[A12][A7] - k_{su,A12A10}[A12A7][A10] \quad (3.36)$$

$$\frac{d[A10]}{dt} = -k_{su,A12A10}[A12A7][A10] + k_{su,A12A5}[A12A10][A5] \quad (3.37)$$

$$\frac{d[A12A10]}{dt} = k_{su,A12A10}[A12A7][A10] - k_{su,A12A5}[A12A10][A5] \quad (3.38)$$

$$\frac{d[A5]}{dt} = -k_{su,A12A5}[A12A10][A5] \quad (3.39)$$

$$\frac{d[A12A5]}{dt} = k_{su,A12A5}[A12A10][A5] - k_{as,A12A5A16}[A12A5][A16] + k_{di,A12A5A16}[A12A5A16] \quad (3.40)$$

$$\frac{d[A16]}{dt} = -k_{as,A12A5A16}[A12A5][A16] + k_{di,A12A5A16}[A12A5A16] \quad (3.41)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[A12A5A16]}{dt} &= k_{as,A12A5A16}[A12A5][A16] - k_{di,A12A5A16}[A12A5A16] \\ &+ k_{di,LIA3A12A5A16}[LIA3A12A5A16] - k_{as,LIA3A12A5A16}[LIA3][A12A5A16] \\ &+ k_{di,A3A12A5A16}[A3A12A5A16] - k_{as,A3A12A5A16}[A3][A12A5A16] \end{aligned} \quad (3.42)$$

$$\frac{d[A3]}{dt} = -k_{su, LIA3}[LIA7][A3] + k_{di, A3A12A5A16}[A3A12A5A16] - k_{as, A3A12A5A16}[A3][A12A5A16] \quad (3.48)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[LIA3]}{dt} &= k_{su, LIA3}[LIA7][A3] - k_{as, LIA3A12A5A16}[LIA3][A12A5A16] \\ &+ k_{di, LIA3A12A5A16}[LIA3A12A5A16] \end{aligned} \quad (3.49)$$

$$\begin{aligned} \frac{d[LIA3A12A5A16]}{dt} &= -k_{su, LIA3}[LIA7][A3] + k_{as, LIA3A12A5A16}[LIA3][A12A5A16] \\ &- k_{di, LIA3A12A5A16}[LIA3A12A5A16] \end{aligned} \quad (3.50)$$

$$\frac{d[A3A12A5A16]}{dt} = k_{as, A3A12A5A16}[A3][A12A5A16] - k_{di, A3A12A5A16}[A3A12A5A16] \quad (3.51)$$

$$\frac{d[PE]}{dt} = -k_{su, LIPE}[LIA3][PE] \quad (3.52)$$

$$\frac{d[LIPE]}{dt} = k_{su, LIPE}[LIA3A12A5A16][PE] - k_{as, LC3^*}[LIPE][MP] \quad (3.53)$$

Una etapa importante del modelo es la que se muestra en la Ecuación 3.54, que muestra el secuestro de proteína mal plegada por parte de la membrana del autofagosoma. Esto propiciado por la presencia de la proteína LC3 activada.

$$\frac{d[LC3^*]}{dt} = k_{as, LC3^*}[LIPE][MP] - k_{fc, Atf}[LC3^*][Ptd_3p][L^*] \quad (3.54)$$

Transporte de lípidos

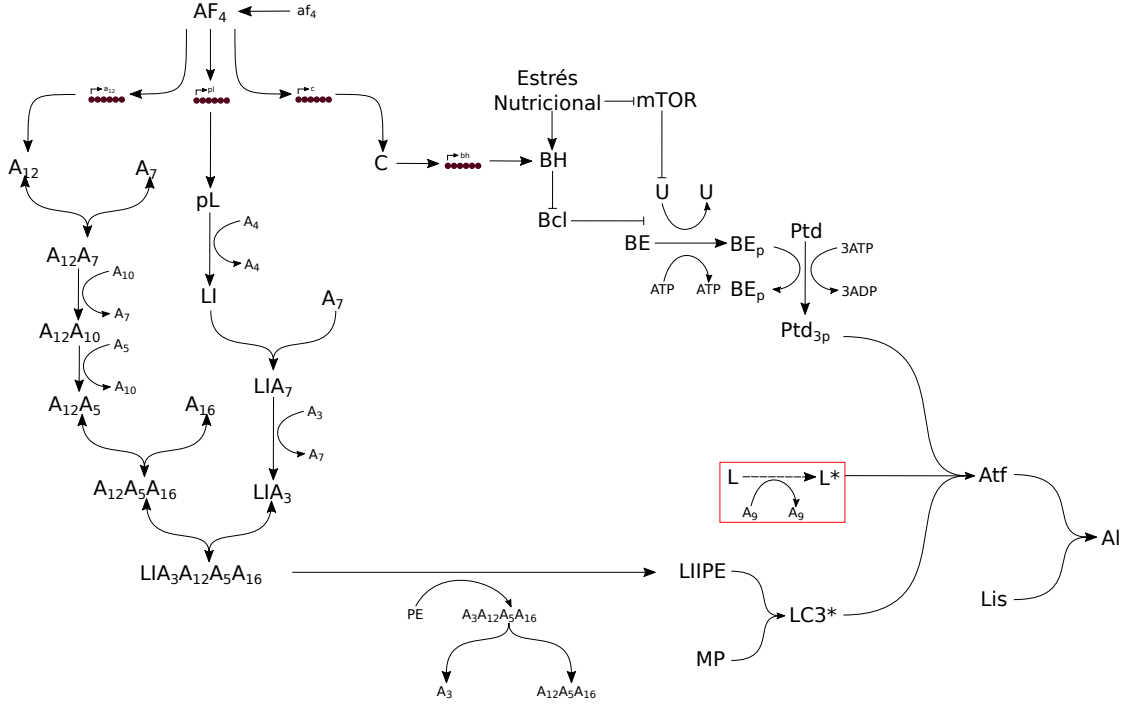


Figura 3.9: Sección de transporte de lípidos.

El transporte de lípidos dentro de la célula ocurre debido al movimiento de vesículas. Atg9 es una proteína transmembrana que reconoce proteínas como WIPI para añadir las membranas transportadas al lugar correcto. Esta función es descrita mediante las Ecuaciones 3.55, 3.56, A.12 y 3.58

$$\frac{d[L]}{dt} = k_{di,LA9}[L][A9] - k_{as,LA9}[LA9] \quad (3.55)$$

$$\frac{d[LA9]}{dt} = k_{as,LA9}[LA9] - k_{di,LA9}[L][A9] - k_{tp,L}[LA9] \quad (3.56)$$

$$V_{LA9} = \frac{(V_{max}^{A9})(L)}{K_{A9} + (L)} \quad (3.57)$$

$$\frac{d[L^*]}{dt} = k_{tp,L}[LA9] - k_{fc,Atf}[LC3^*][Ptd_{3p}][L^*] \quad (3.58)$$

3.2. Parámetros

En el modelo anteriormente descrito se muestra un conjunto de parámetros (detalles en la Tabla B.2 del Anexo B), cada uno cumple funciones diferentes y poseen valores distintos. Para realizar la simulación es necesario hacer una búsqueda bibliográfica, con el objetivo de entregar un valor a cada uno de éstos parámetros.

Los parámetros son clasificados en 14 grupos (ver lista en Tabla B.3 del Anexo B). Alguno de estos grupos son subdivididos basándose en criterios como tipo de interacción, el tamaño de las proteínas interactuantes, entre otros.

Se entregarán valores bibliográficos o aproximaciones de todos los parámetros, sin embargo, algunos de ellos se variarán al realizar la simulación, con el objetivo de describir de mejor forma el proceso biológico.

A continuación se presentan los valores de los parámetros, los grupos y algunas de sus subclasificaciones.

3.2.1. Velocidad máxima de transcripción y constante de afinidad

El parámetro β corresponde a la máxima velocidad con que un mensajero puede ser transcrito. La velocidad de transcripción es igual a β solo si todo el promotor se encuentra adherido a los sitios disponibles del ADN.

Se toma como supuesto que, los promotores actúan de la misma forma y con la misma fuerza en todos los casos estudiados, además de tener características similares todos los sitios de unión promotor-ADN. Debido a estas suposiciones, se considera de todos los parámetros β poseen el mismo valor.

β : El valor de la constante encontrada en literatura depende de la función y tipos de promotores, variando desde $30 M s^{-1}$ en reparadores de rotura de doble cadena a $3300 M s^{-1}$ en sitios de transcripción de proteínas autoescindidas. Se asume un valor similar a reguladores transcripcionales de $2200 M s^{-1}$ [36].

Debido a las consideraciones anteriores, los valores de la constante de afinidad del promotor al sitio de unión será igual en todos los casos.

$K_{d,RNA}$: Se considera la constante de afinidad de todos los mensajeros igual a la de CHOP. La que posee un valor de $6,6 \cdot 10^{-5} s^{-1}$ [43].

3.2.2. Cantidad total de proteínas

Cada una de las proteínas dentro de la célula, en su análisis dinámico, se encuentra a una concentración distinta, la que varía con el tiempo. En el caso de las dinámicas modeladas

por medio de los supuestos de estado estacionario, es necesario establecer un número inicial o total de enzima.

Se considera que todas se expresan en primera instancia a $0,6 \mu\text{M}$ suponiendo un volumen celular de $3 \cdot 10^{-12} L$ [37]. Las concentraciones agrupadas son:

- $A4^{\text{tot}}$
- $A9^{\text{tot}}$
- B^{tot}
- BE_p^{tot}
- P_p^{tot}
- U^{tot}

3.2.3. Constantes cinéticas de asociación a un complejo

Las constantes cinéticas de asociación a un complejo o de formación de complejo se agruparán dependiendo de la interacción que tengan los componentes. Esto debido a que algunos tipos de interacciones son más fuertes que otras. Por ejemplo, destruir una unión no covalente como una interacción electrostática puede requerir aproximadamente $1,4 \text{ kcal mol}^{-1}$, mientras tanto, destruir una unión covalente C-H requiere de $100 \text{ kcal mol}^{-1}$ [38].

Unión no covalente

El modelo presenta una unión no covalente entre el Atg12-Atg5 y Atg16. La interacción ocurre entre el extremo C-Terminal de Atg16 y el extremo opuesto de Atg5.

$k_{\text{as,A12A5A16}}$: el valor de esta constante es $7,6 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ a condiciones de pH 7,4 [39].

Uniones covalentes

Dentro de este subgrupo se encuentran las uniones de tipo E1 covalentes tioéster (ver Anexo A.1.5), uniones con acción inhibitoria y otras uniones covalentes.

Tipo E1: El valor de estas interacciones se asume igual a $0,8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ que corresponde al doble de k_{cat} de una reacción de tipo E1, debido a que esta reacción no fue modelada mediante Michaelis Menten [40]. Las constantes que se encuentran en este subgrupo son:

- $k_{\text{as,A12A7}}$
- $k_{\text{as,LIA7}}$

Con acción inhibitoria: Son las interacciones de unión covalente que inhiben la acción de un componente. El inhibidor BH3-only tiene que ejercer una acción rápida contra el inhibidor

Bcl-2. Debido a esto se asume una constante de equilibrio con la misma orden de magnitud que una unión de fosforilación pero que favorezca la formación del complejo (cerca a 10^{-5}). El valor de las constantes es $1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Los parámetros del subgrupo son:

- $k_{\text{as,BHBcl}}$
- $k_{\text{as,BEBcl}}$

Otras uniones covalentes: Son interacciones para formación de complejo, estos valores tienden a estar entre 10^3 y $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, así como las constantes de disociación tienden a tomar valores entre 10^{-1} y 10^{-6} s^{-1} [41]. La constante de asociación de estos componentes se asume con el valor de $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [41]. Los elementos asociados a este valor son:

- $k_{\text{as,BMP}}$
- $k_{\text{as,BP}}$
- $k_{\text{as,LA9}}$
- $k_{\text{as,LC3*}}$
- $k_{\text{as,LIA3A12A5A16}}$

Asociación para escisión

Corresponde a la constante cinética asociada a la unión enzima-sustrato para la escisión de proLC3. $k_{\text{as,pLA4}}$ tiene un valor aproximado de $2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [42].

Asociaciones para fosforilación

En este grupo se encuentran los complejos formados por kinasas y sus sustratos. Se asume que todos poseen mecanismos de similares características, por lo que comparten los mismos valores. Las constantes vinculadas con esta función son:

- $k_{\text{as,ePp}}$
- $k_{\text{as,PtdBEp}}$
- $k_{\text{as,UBE}}$

Todas ellas tienen el valor de la constante asociada a la activación del complejo Beclin $5,5 \cdot 10^{-19} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [37].

3.2.4. Constantes cinéticas de sustitución de un componente

Estas constantes cinéticas acompañan a procesos de sustitución de un componente por otro en un complejo. Todas tienen actividad E1 o E2 (enlaces tioéster), por lo que se asume que todas poseen el mismo valor igual a $0,8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [40]. Los parámetros agrupados son:

- $k_{\text{su,A12A10}}$

- $k_{su,A12A5}$
- $k_{su,LIA3}$
- $k_{su,LIA7}$
- $k_{su,LIPE}$
- $k_{su,LIPE}$

3.2.5. Constantes cinéticas de fosforilación

Estas constantes corresponden a las asociadas a la fosforilación de un componente por medio de la acción de una enzima kinasa. Se asume que todas las fosforilaciones del sistema poseen características similares, por lo que tendrán el mismo valor igual a 1 s^{-1} [37]. Las siguientes constantes se encuentran en este grupo:

- k_{fos,BE_p}
- $k_{fos,ep}$
- $k_{fos,P}$
- $k_{fos,Ptd3p}$

3.2.6. Constante cinética de desfosforilación

La constante cinética de desfosforilación de PERK se relaciona con la de fosforilación mediante la relación de equilibrio en estado estacionario. El valor de la constante es la siguiente:

$k_{des,P}$: El valor de la constante cinética será igual a la de la acción de una fosfatasa. De este modo se obtiene un valor de $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ [43].

Por lo que al resolver la ecuación de equilibrio, se obtiene $k_{eq,P}$ igual a $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

3.2.7. Constantes cinéticas de disociación de un complejo

Las constantes cinéticas de disociación se relacionan directamente con las de asociación mediante el análisis del estado estacionario. En este estado existirá una relación denominada constante de equilibrio.

Unión no covalente

Para la unión no covalente de Atg12-Atg5 con Atg16 se posee la siguiente constante cinética:

$k_{di,A12A5A16}$: Esta constante tiene un valor de $5,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Por lo que la constante de equilibrio es aproximadamente $6,9 \mu\text{M}$ [39].

Disociación de complejos de inhibición

Tal como se explicó en la sección de asociación, se supone una dinámica similar a la de fosforilación, debido al tipo de interacción de los componentes. Debido a esto se asume un valor de $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Las constantes asociadas a este valor son las siguientes:

- $k_{\text{di,BHBcl}}$
- $k_{\text{di,BEBcl}}$

Disociaciones de complejos de fosforilación

Las constantes asociadas a este grupo son las siguientes:

- $k_{\text{di,ePp}}$
- $k_{\text{di,PtdBEp}}$
- $k_{\text{di,UBE}}$

Estas comparten el mismo valor igual a $0,1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, resultando con una constante de equilibrio de $1,8 \cdot 10^{17}$ [37]

Disociación en proceso de escisión

Corresponde a la constante de disociación del complejo formado por Atg9 y proLC3 para su posterior escisión. La constante $k_{\text{di,pLA4}}$ tiene un valor de $0,1 \text{ s}^{-1}$ [42].

Otras disociaciones covalentes

En este subgrupo se encuentran las siguientes constantes:

- $k_{\text{di,BMP}}$
- $k_{\text{di,BP}}$
- $k_{\text{di,LA9}}$
- $k_{\text{di,LIA3A12A5A16}}$

Debido al tipo de unión y al valor de sus pares constantes de asociación, se asume un valor de 10^{-5} s^{-1} [41]. Por lo que se obtiene una constante de equilibrio igual a $0,1 \text{ nM}$.

3.2.8. Constante cinética de degradación de un componente

La única constante de degradación considerada en el modelo es la del autolisosoma. Esta degradación es importante en el proceso, ya que describe la eliminación del autolisosoma con

proteína mal plegada.

$k_{d,AI}$: La constante tiene un valor de $4,5 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ [37].

3.2.9. Constante cinética de escisión

Es la constante cinética del proceso de escisión del C-terminal de proLC3. Este tiene un valor de $9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ [44].

3.2.10. Constantes cinéticas de formación de vesícula

Se tienen dos constantes en este grupo, las que se asocian a los procesos de formación del autofagosoma y autolisosoma.

- $k_{fc,Atf}$: Corresponde al proceso de unión de todos los componentes que forman la vesícula se asume similar a la cinética de formación de una vesícula ajustada por las unidades de medida $0,05 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$ [37].
- $k_{fc,AI}$: Corresponde al proceso de unión de dos vesículas y tiene el valor de $2,8 \cdot 10^{-16} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [37].

3.2.11. Constante cinética de plegamiento

La constante catalítica del replegamiento de proteína mal plegada debido a la acción de BiP ($k_{p,PP}$) tiene un valor igual a $7 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ [45].

3.2.12. Constantes cinéticas del proceso de traducción

La velocidad de traducción depende en gran parte del largo del mensajero y por ende del tamaño de la proteína, por esto se harán dos subgrupos con valores distintos:

- $k_{td,A12}$, $k_{td,AF4}$ y $k_{td,C}$: Su valor es igual al de la traducción de CHOP y equivale a $0,05 \text{ s}^{-1}$ [43].
- $k_{td,BH}$, $k_{td,MP}$ y $k_{td,pL}$: Su valor corresponde a la expresión de BiP y es igual a $0,001 \text{ s}^{-1}$ [43].

3.2.13. Constantes cinéticas del transporte de lípidos

Se asume que el transporte mediado por Atg9 luego de su unión con los lípidos, sigue una dinámica similar a otros transportes en el citoplasma. Es por esto que $k_{tp,L}$ es igual a $8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ [46].

3.2.14. Constantes de Michaelis Menten

La constante depende de la afinidad que tenga la enzima por su sustrato. Estos valores se obtienen a partir de las constantes cinéticas de las interacciones de la enzima, es decir, de asociación y disociación del complejo y de formación de producto mediante la siguiente ecuación:

$$K = \frac{k + k_{-1}}{k_1}$$

Donde k representa la constante de formación de producto, k_1 la constante de asociación del complejo y k_{-1} la de disociación del complejo. Los resultados son los siguientes:

- $K_{A4} = 5 \cdot 10^{-6}$
- $K_{A9} = 10^{-5}$
- $K_B = 7 \cdot 10^{-7}$
- $K_{BE_p} = 2 \cdot 10^{18}$
- $K_{P_p} = 2 \cdot 10^{18}$
- $K_U = 2 \cdot 10^{18}$

3.3. Simulaciones

A continuación se muestran los gráficos correspondientes a la simulación del modelo. Algunos parámetros fueron ajustados con el fin de describir el proceso biológico de mejor forma. Los valores de los parámetros utilizados se encuentran en la Tabla B.4 del Anexo B.

3.3.1. Subsistemas

Con el objetivo de analizar el comportamiento de las interacciones entre componentes por separado, se divide el modelo en 8 subsistemas:

- **Reconocimiento de proteína mal plegada:** Corresponde a la asociación de BiP y proteína mal plegada, con su consecuente replegamiento.
- **Fosforilación de PERK y *eIF2 α* :** Esta etapa incluye la disociación de BiP-PERK, homodimerización y autofosforilación de PERK y fosforilación de *eIF2 α* .
- **Producción de ATF4 y regulación de traducción:** Incluye la traducción de ATF4 mediante la acción de *eIF2 α* . Del mismo modo, incorpora la regulación de traducción de Atg12, CHOP, BH3-only y proLC3.
- **Iniciación de la formación de membrana y fase de nucleación:** Esta etapa corresponde a la iniciación de la formación de la membrana del autofagosoma, mediada por la activación de ULK1. Se incorpora la función de Beclin y la generación de PtdIns3P.

- **Producción del complejo Atg12-Atg5-Atg16:** Como su nombre lo indica, este subsistema engloba los pasos necesarios para la generación del complejo Atg12-Atg5-Atg16.
- **Activación de LC3:** Este subsistema comprende las interacciones de las proteínas Atg para activar y lipidar a LC3.
- **Transporte de lípidos:** Corresponde al transporte de las membranas realizadas en vesículas y mediadas por Atg9.
- **Formación de Autofagosoma, Lisosoma y Autolisosoma:** Este subsistema es el último estudiado y corresponde a la formación de los compartimentos nombrados. Se incluye la degradación del autolisosoma.

A continuación se presentan los gráficos y discusiones de cada una de las simulaciones realizadas para cada subsistema.

Reconocimiento de proteína mal plegada

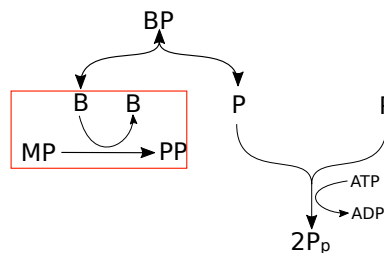


Figura 3.11: Sección de reconocimiento de proteína mal plegada.

En la Figura 3.12 se aprecia la función de la proteína B. Esta logra disminuir la concentración de MP a niveles mínimos, generando un reensamblamiento de la misma.

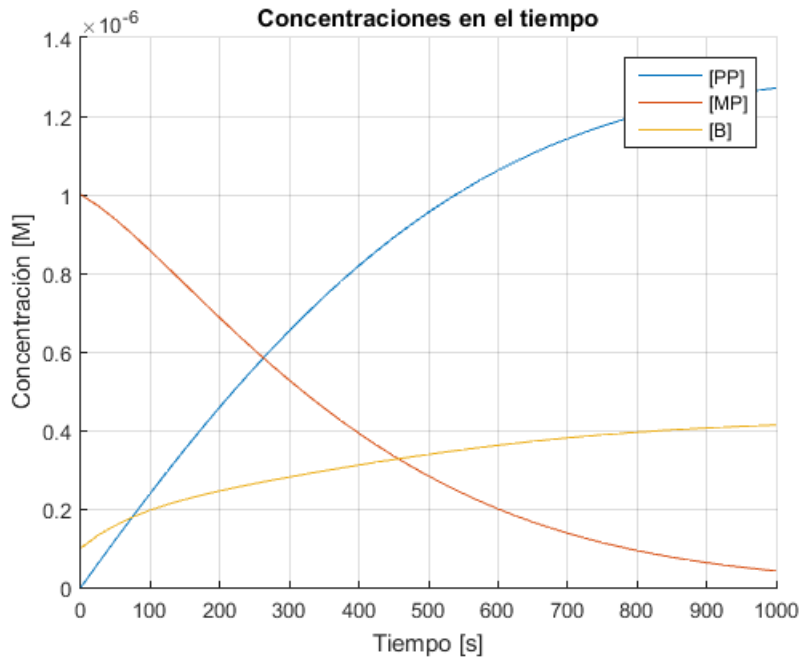


Figura 3.12: Subsistema de reconocimiento de proteína mal plegada y posterior replegamiento. Donde B corresponde a proteína BiP, MP a proteína mal plegada y PP a proteína correctamente plegada.

Se observa que se logra llegar a la concentración máxima aproximadamente a los 16 minutos. Cercanos a los 10 minutos que tarda una enzima de similares características en el proceso de replegamiento [47].

Fosforilación de PERK y *eIF2α*

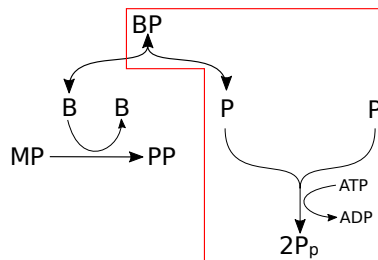


Figura 3.13: Sección de homodimerización y fosforilación de PERK.

Este proceso se inicia con concentraciones de B y P iguales a $10^{-7} M^{-1}$, es por ello que se aprecia en la Figura 3.14, un aumento del complejo BP. Sin embargo, con las proteínas libres se logra representar la fosforilación de P y e.

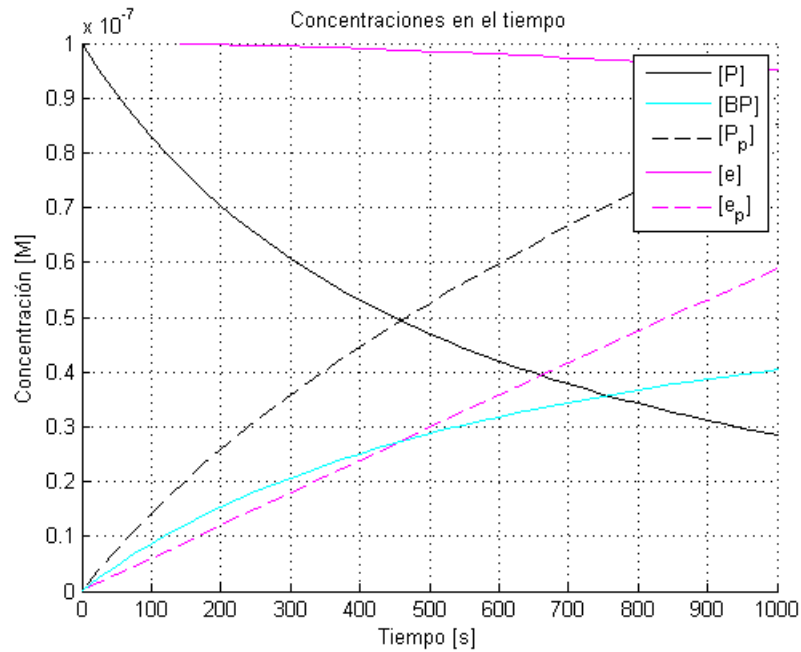


Figura 3.14: Subsistema de fosforilación de proteínas PERK y $eIF2\alpha$. Donde B corresponde a BiP, P a PERK, BP al complejo conformado por BiP y PERK, P_p a PERK fosforilado, e al factor $eIF2\alpha$ y e_p al mismo factor fosforilado

Esta simulación no logra representar la inhibición de la traducción global de proteínas, al no disminuir drásticamente las concentraciones de e.

Producción de ATF4 y regulación de traducción

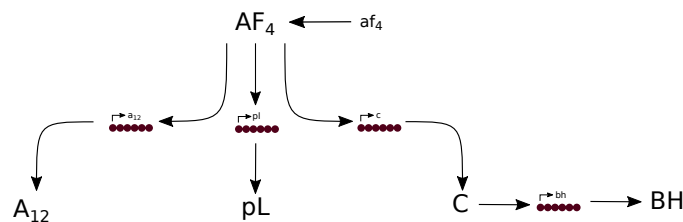


Figura 3.15: Sección de producción de ATF4 y regulación de traducción.

En la Figura 3.16 se aprecian los RNAs mensajeros producidos debido a la regulación del sistema, en especial por la presencia del factor AF4. Se puede ver que el único mensajero que es producido mediante una dinámica más lenta es el inhibidor bh, pues su expresión depende de la concentración de la proteína CHOP y no de AF4 como las demás.

Debido al tipo de ecuación que describe el comportamiento de la síntesis de RNA, de tipo hipérbolo, se espera que alcancen un máximo, lo que no ocurre dentro de los primeros 2000 segundos.

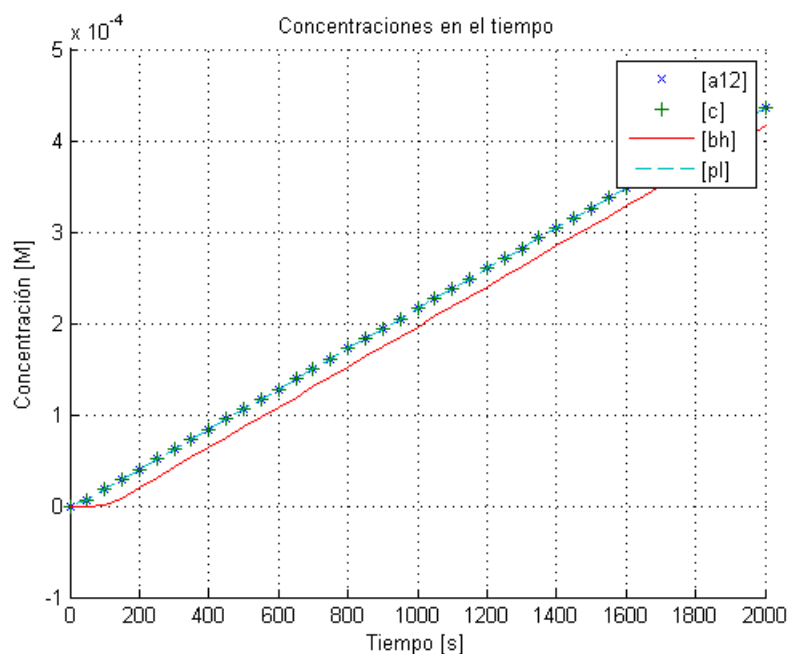


Figura 3.16: Traducción de proteínas. Donde los valores corresponden a los RNAs mensajeros de Atg12, CHOP, BH3-only y proLC3.

En las Figuras 3.17 y 3.18 se presentan los gráficos de proteínas producidas mediante los RNAs expresados. Se asume que a niveles normales se encuentran a una concentración despreciable, solo expresándose cuando son sometidas a estrés.

Se aprecia que AF4 posee al inicio de la simulación, y hasta el segundo 800, una concentración mayor que el resto de proteínas. Esto se debe a la ecuación que la representa y a los parámetros utilizados, describiendo que este elemento es el que inicia la cadena de regulaciones, reaccionando más rápido al estímulo de fosforilación del factor eIF2 α .

La concentración de BH es siempre menor que la de pL debido a razones análogas a las abordadas para sus mensajeros, BH depende de la concentración de C para su expresión, el que a su vez depende de AF4.

Los valores máximos alcanzados en esta ventana de simulación fueron de $4,5 \cdot 10^{-7} M$ aproximadamente. No se recomienda simular en un tiempo prolongado ya que estas expresiones tienen forma exponencial, por lo que los resultados no describirán el comportamiento de las células.

Es posible notar que los resultados, en general, se encuentran en el rango esperado de concentración de una proteína dentro de una célula, entre $10^{-7} M$ y $10^{-3} M$ aproximadamente [48].

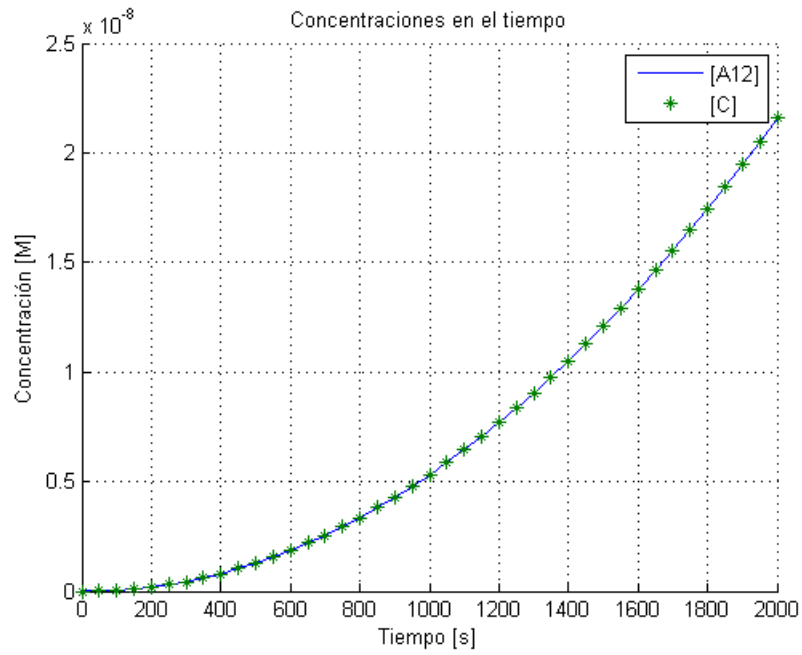


Figura 3.17: Transcripción de proteínas. Donde A12 corresponde a la proteína Atg12 y C a CHOP.

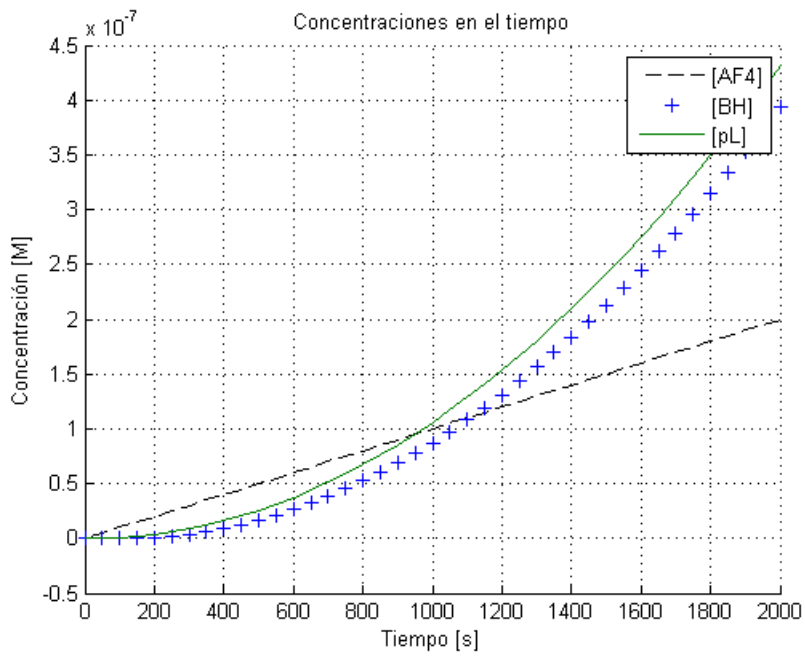


Figura 3.18: Transcripción de proteínas. Donde AF4 corresponde al factor ATF4, BH a BH3-only y pL a proLC3.

Iniciación de la formación de membrana y fase de nucleación

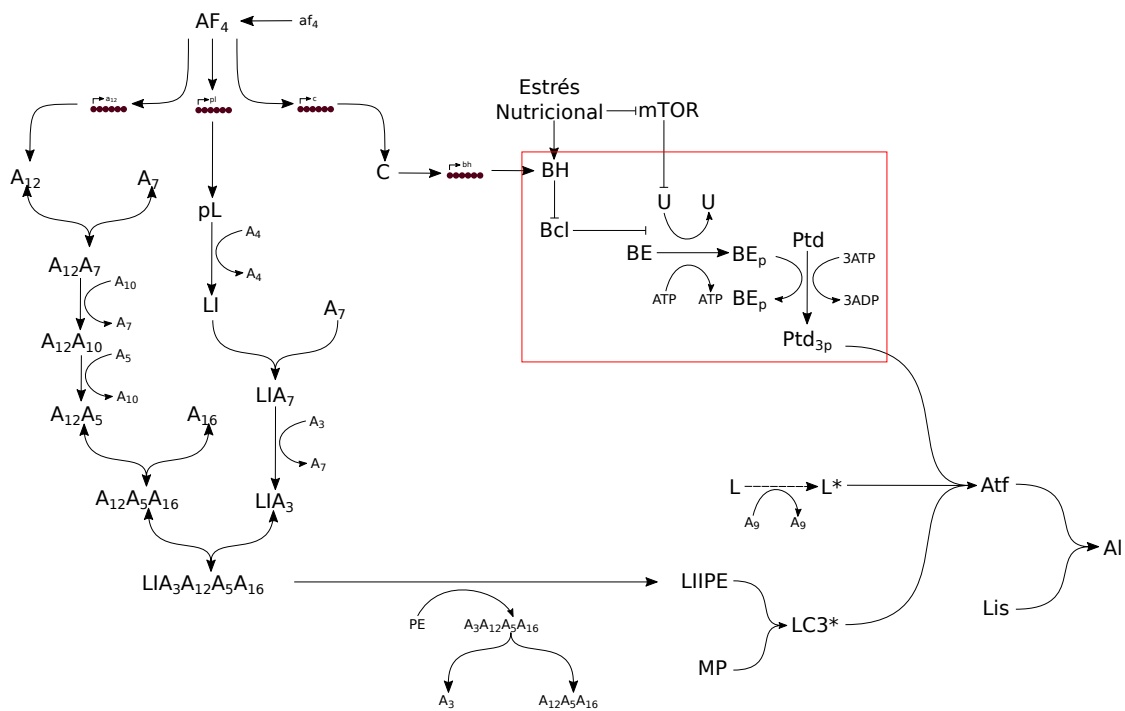


Figura 3.19: Sección de nucleación en la formación de la membrana del autofagosoma.

La simulación de esta etapa se puede observar en la Figura 3.20.

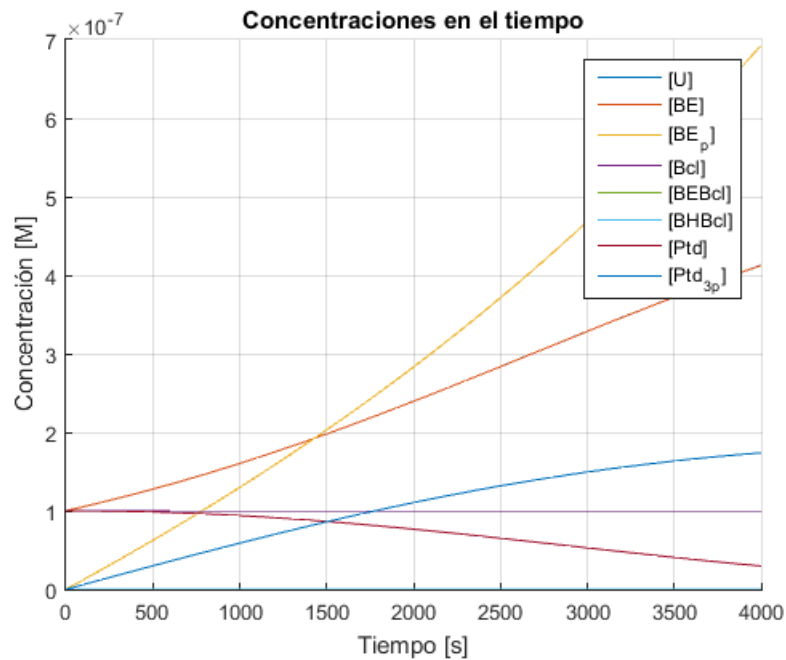


Figura 3.20: Subsistema iniciación y nucleación en la formación de la membrana del autofagosoma. Donde U corresponde al complejo Ulk, BE al complejo Beclin, BE_p al mismo complejo en su forma fosforilada, Bcl a Bcl-2, BEBcl al complejo conformado por Beclin y Bcl-2, BHBcl al complejo formado por BH3-only y Bcl-2, Ptd a PtdIns y Ptd_{3p} a PtdIns3P

Se observa una correcta iniciación del proceso de nucleación, en cuanto BE fue fosforilada por la acción de U. Por otra parte, se observa que a pesar de la presencia de una concentración casi constante de inhibidor Bcl desacoplado, este no tiene un efecto drástico en la inhibición del proceso, es más, si se simula sin presencia de inhibidor de Bcl (BH) no se observan cambios aparentes (ver Figura 3.21).

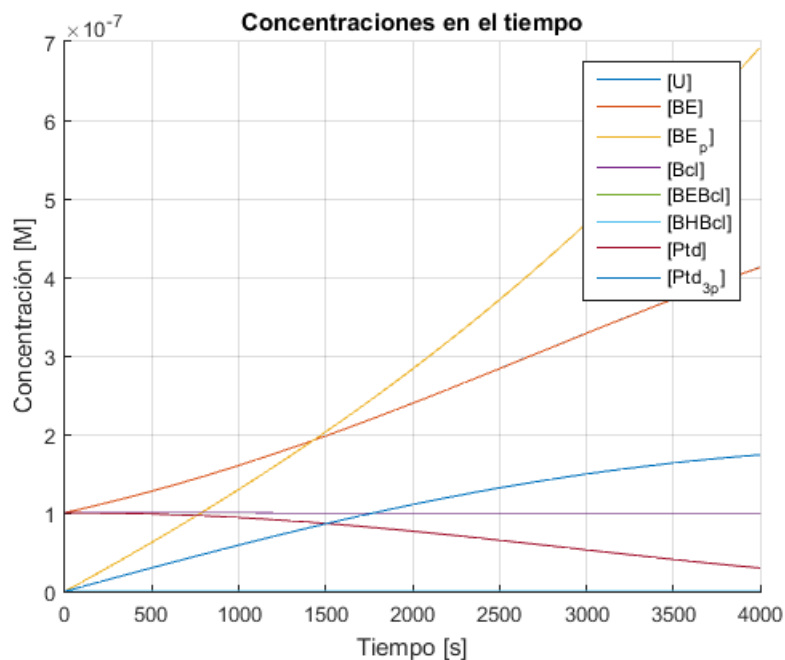


Figura 3.21: Nucleación sin inhibidor BH. Donde U corresponde al complejo Ulk, BE al complejo Beclin, BE_p al mismo complejo en su forma fosforilada, Bcl a Bcl-2, BEBcl al complejo conformado por Beclin y Bcl-2, BHBcl al complejo formado por BH3-only y Bcl-2, Ptd a PtdIns y Ptd_{3p} a PtdIns3P

Lo anterior puede deberse a multiples causas, entre ellas, constantes cinéticas que no dan cuenta del proceso real o el modelo no representa el mecanismo de inhibición.

Finalmente, a pesar de la falta de regulación en la inhibición, se muestra que el proceso logra la fosforilación de Ptd, por lo que describe el funcionamiento de la nucleación.

Producción del complejo Atg12-Atg5-Atg16

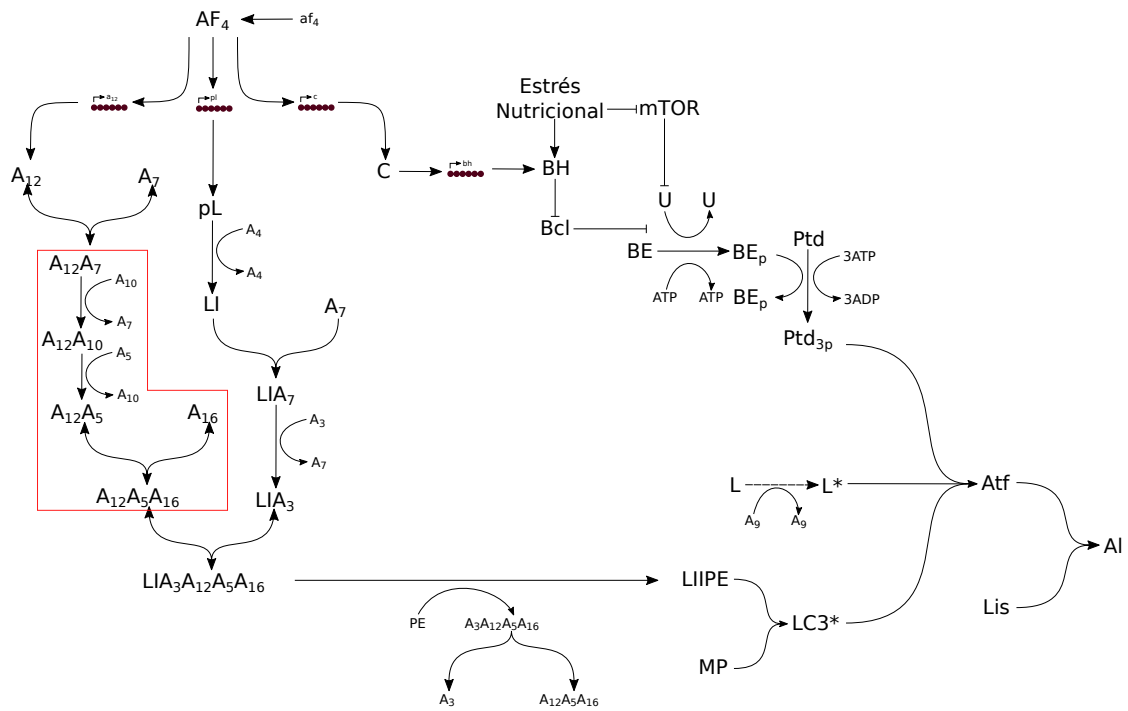


Figura 3.22: Sección de producción del complejo Atg12-Atg5-Atg16.

Es posible ver el cambio de concentración de las variables analizadas en la Figura 3.23.

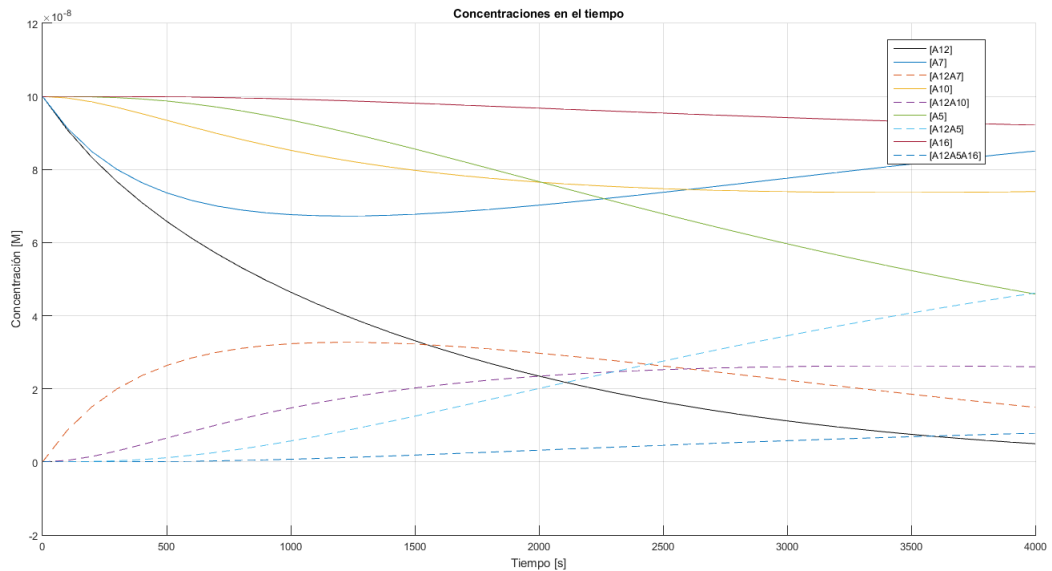


Figura 3.23: Subsistema de formación del Complejo A12A5A16. Donde A corresponde a las proteínas Atg con su correspondiente número.

En líneas punteadas se logran apreciar las concentraciones de los complejos formados debido a la asociación de las enzimas. Estos poseen la característica forma de campana, que indican la correcta formación y posterior disociación de las mismas.

Finalmente se genera el complejo A12A5A16, el que posteriormente se utilizará en la activación de LC3.

Activación de LC3

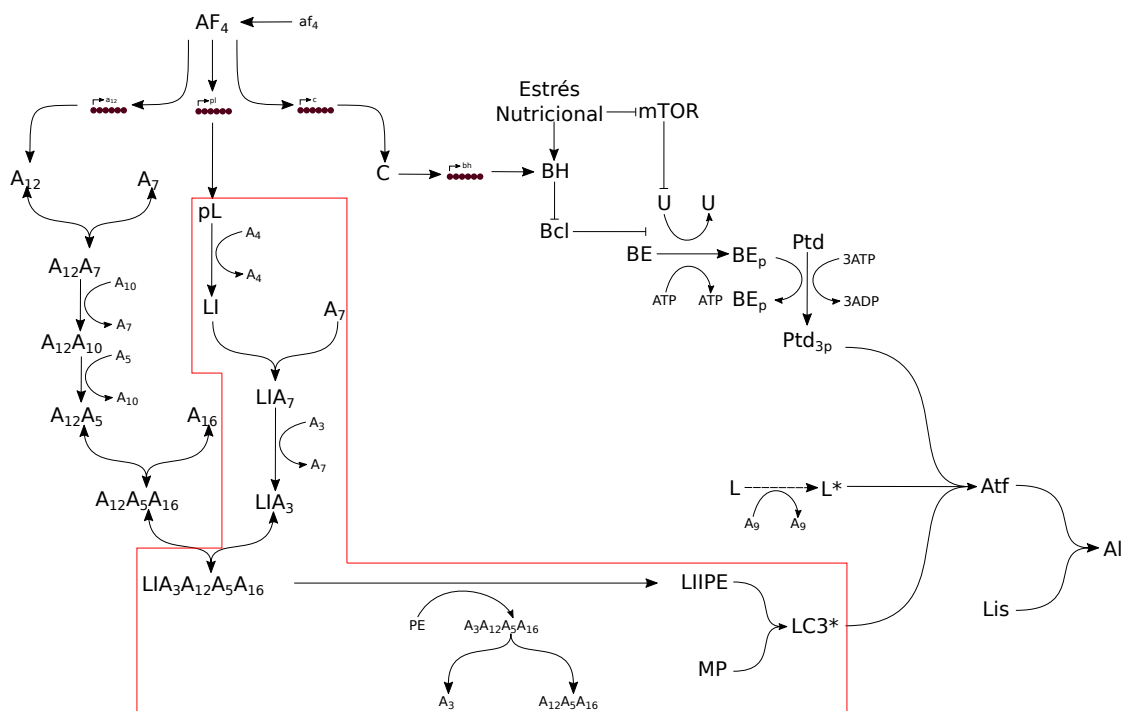


Figura 3.24: Sección de activación de LC3.

Varios son los componentes que participan en la activación de LC3 (ver Figura 3.25). El proceso inicia con la transformación de pL en LI debido a la escisión de su C-terminal.

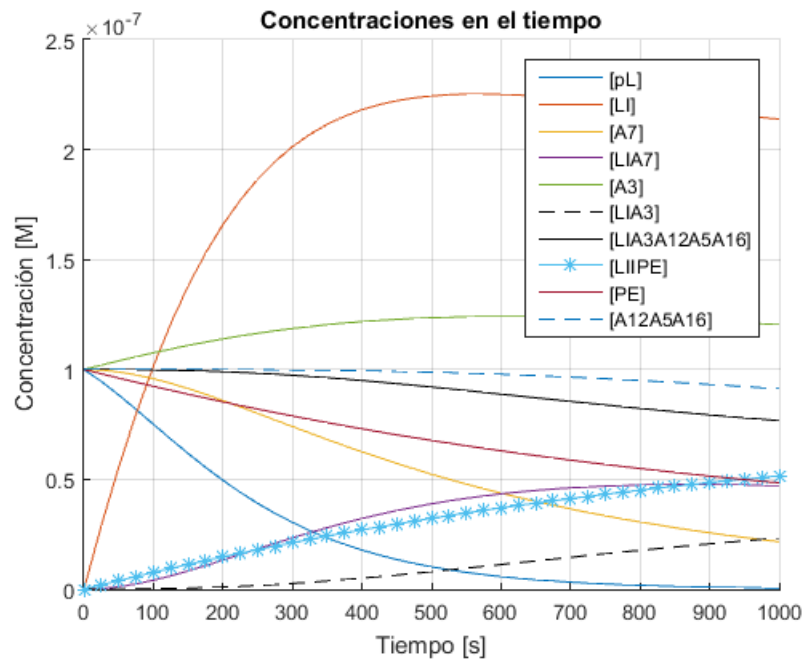


Figura 3.25: Subsistema de Activación y lipidación de LC3. Donde pL corresponde a proLC3, LI a LC3-I, A a las proteínas Atg con su correspondiente número, LIPE al complejo conformado por LC3-II y PE y la unión de estas siglas a la formación de complejos.

Debido a esta acción, la concentración de pL decae continuamente. Por otra parte, la concentración de LI aumenta en los primeros 9 minutos, para luego disminuir dada a las asociaciones a la que esta proteína se ve enfrentada.

Finalmente, la simulación describe la formación de LIPE, la que posteriormente se unirá a MP para eliminarla en el autolisosoma.

Transporte de lípidos, Formación de Autofagosoma y Autolisosoma

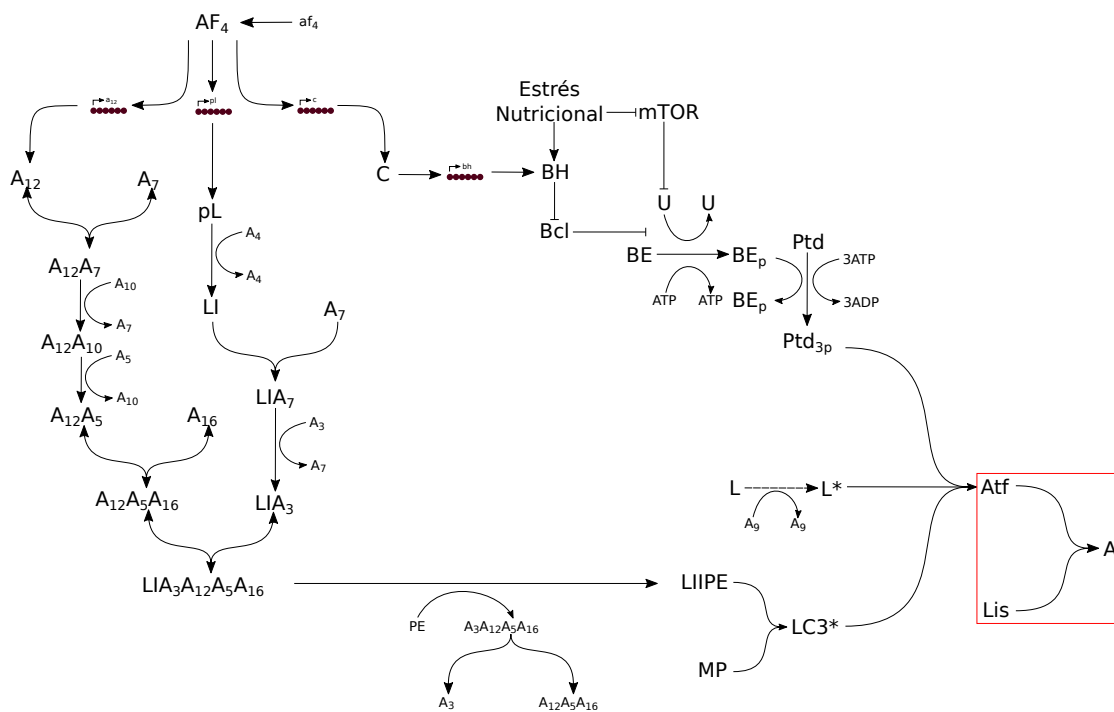


Figura 3.26: Sección de formación de las vesículas autofagosoma, lisosoma y autolisosoma.

En la Figura 3.27 se muestra la simulación del transporte de lípidos. Donde se aprecia la disminución de lípido en las diferentes fuentes de suministro para aumentar en el omegasoma.

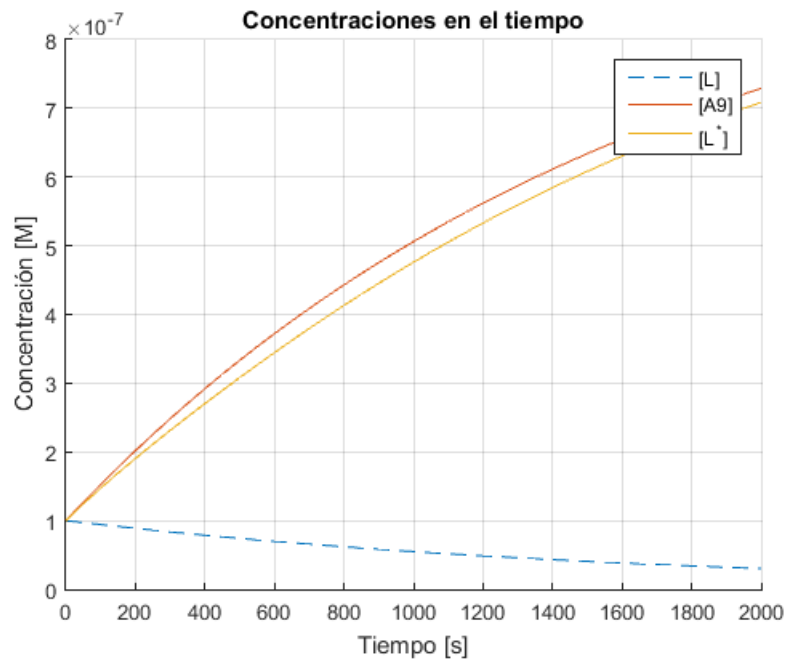


Figura 3.27: Subsistema de Transporte de lípidos. Donde L corresponde a lípidos no transportados, A9 a la proteína intermembrana Atg9 y L^* a lípidos transportados.

De la misma simulación se extraen las concentraciones referentes a la formación del autofosoma y autolisosoma (ver Figura 3.28).

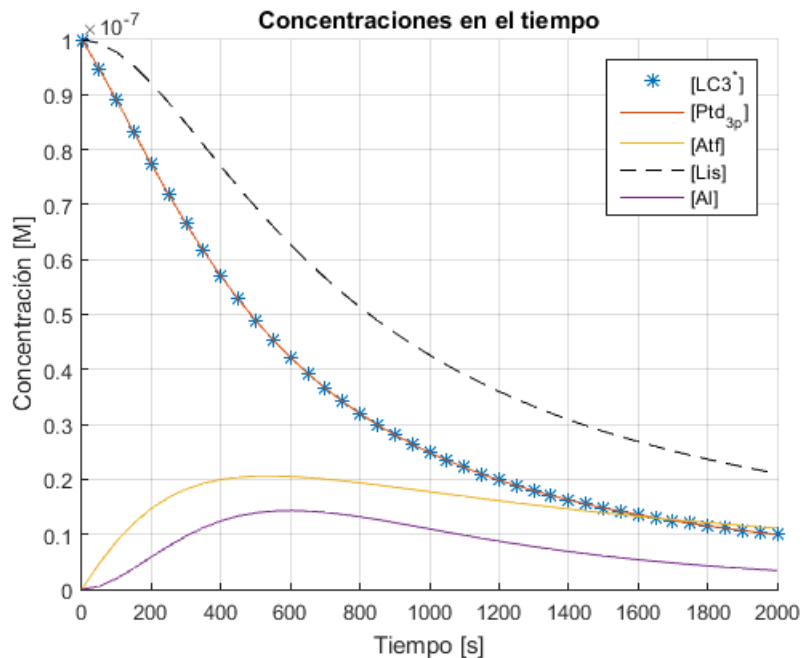


Figura 3.28: Subsistema de formación y degradación del autolisosoma. Donde $LC3^*$ corresponde a LC3 activo y unido a proteína mal plegada, Ptd_{3p} a PtdIns3P, Atf a autofosoma, Lis a lisosoma y Al al autolisosoma.

Aquí se aprecia la disminución de $LC3^*$, Ptd_{3p} y Al, los que se unen para formar el autofagosoma.

Las vesículas Atf y Al tienen un comportamiento similar, esto es debido a que las dos tienen asociados términos de síntesis y eliminación. Sin embargo, las cinéticas son distintas, ya que Atf se forma por la unión de tres elementos y se elimina por su asociación con Lis, en cambio, Al se forma por la unión de dos vesículas y se elimina debido a una tasa de degradación.

Es posible notar que la mayor concentración de Al se forma a los 10 minutos y se degrada cercano a los 30 minutos. Esto describe el comportamiento esperado, ya que el proceso de autofagia es un proceso más lento en comparación con el replegamiento mediado por chaperonas.

3.3.2. Simulación global del modelo

Para representar de mejor manera el proceso, se simula el modelo completo. De esta forma, es posible analizar la interacción de cada uno de los subsistemas y determinar si esas influyen en la dinámica de degradación final de proteínas (ver Figura 3.29 y 3.30 y código Matlab en Anexo D).

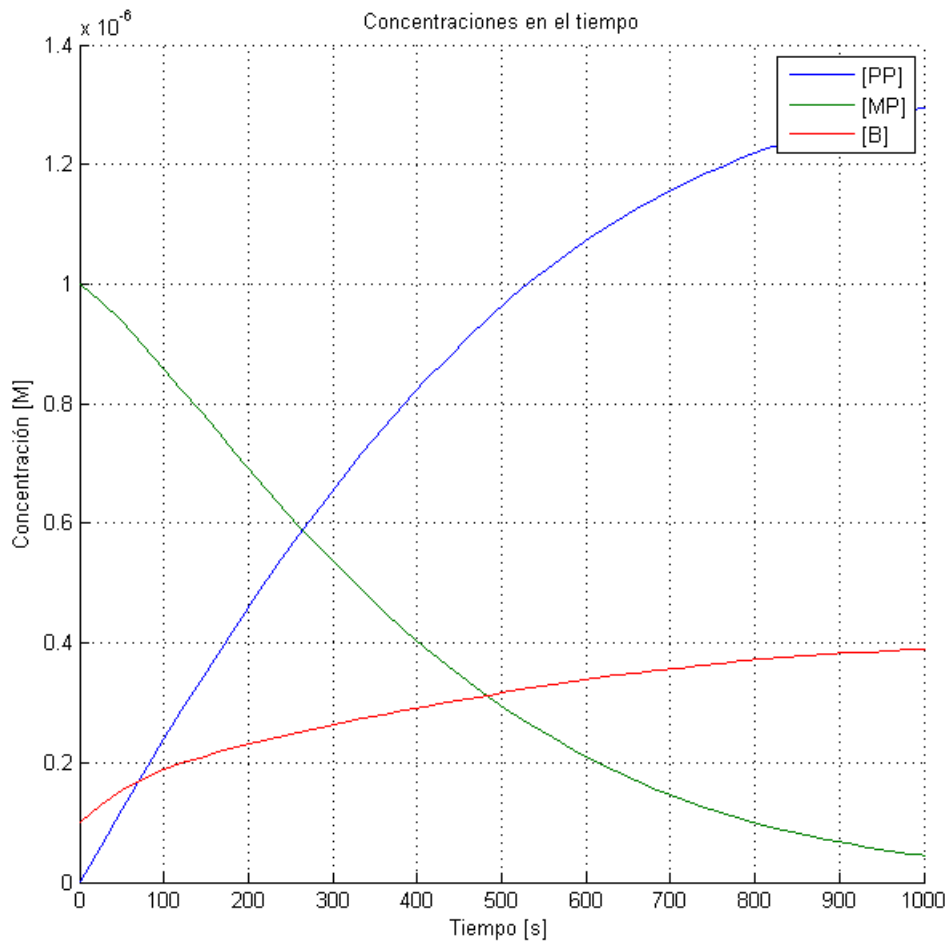


Figura 3.29: Simulación del modelo. Se muestra la primera etapa simulada hasta los 1000 segundos. Donde PP representa la proteína correctamente plegada, MP a la proteína mal plegada y B a BiP.

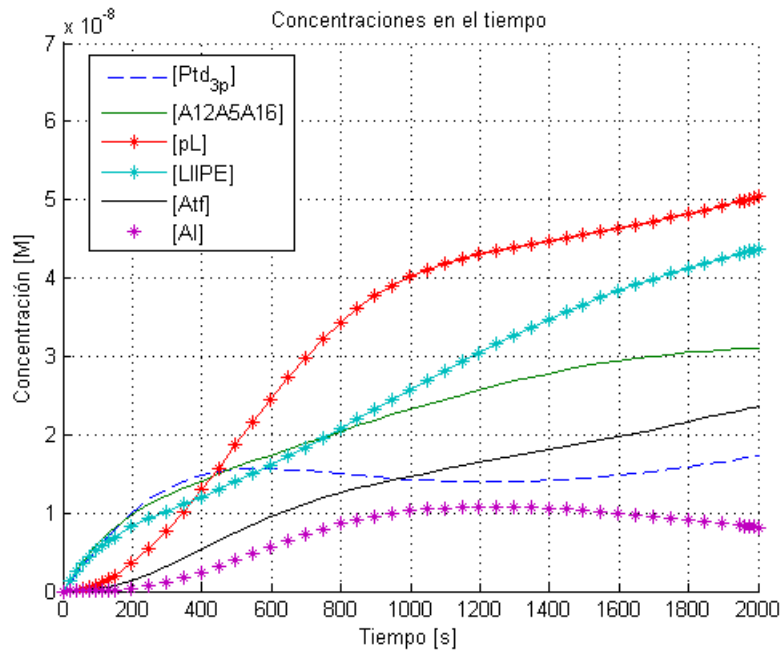


Figura 3.30: Simulación del modelo. Se muestra la degradación del autolisosoma hasta los 2000 segundos. Donde P_p representa a PERK fosforilado, e_p al factor $eIF2\alpha$, Ptd_{3p} a PtdIns3P, A a las proteínas Atg con su correspondiente número, pL a proLC3, LIPE al complejo formado por LC3-II y PE, Atf al autofagosoma y Al al autolisosoma.

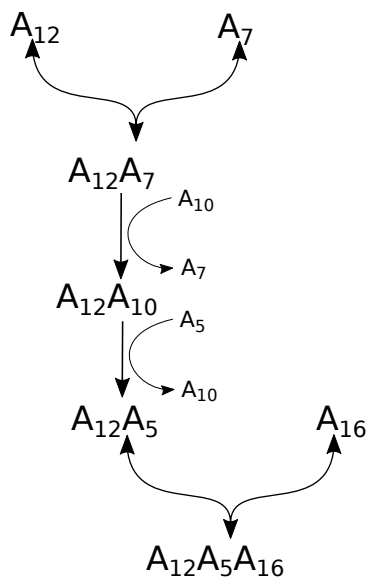
Se aprecia que la proteína proLC3 (pL), a pesar de tener un comportamiento creciente en la simulación, no sigue la forma exponencial de su simulación anterior. Ello se debe a que se transforma en LC3-I, propiciando la formación de vesícula. Es posible notar un cambio en la concavidad de la curva coincidente con la máxima concentración de Al. Es allí donde la dominancia de la ecuación deja de estar en la escisión de pL y pasa a estar en la síntesis de ella.

Se ratifica que el proceso de replegamiento mediada por chaperonas es más rápido que el de degradación por vesículas. Lo que resulta esperable, debido a que el primero busca el replegamiento de proteínas mal plagadas que recién fueron traducidas, en cambio, el segundo mecanismo es el responsable de la degradación de los agregados proteicos.

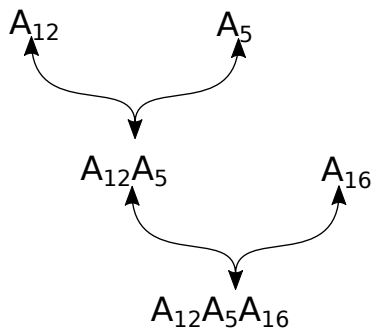
Por otra parte, es posible notar que debido a la interacción de los sistemas se provoca una relentización del proceso de degradación por autolisosoma (Al). Al alcanza su máxima concentración a los 16 minutos aproximadamente, en comparación con los 10 minutos anteriores, también aumenta el tiempo de degradación, más allá de los 30 minutos. Esto se puede deber a que parte de la proteína es replegada en procesos anteriores, retrasando la síntesis de Al.

Finalmente se analiza si es posible simplificar el modelo global. Se decide sintetizar la formación del complejo A12A5A16, pasando del modelo mostrado en la Figura 3.31a al ilustrado en la Figura 3.31b.

Los resultados se pueden ver en la Figura 3.32, el cual muestra que el cambio en la formación de A12A5A16 repercute directamente en la activación de LC3, disminuyendo la



(a) Diagrama original del modelo propuesto.



(b) Diagrama simplificado del modelo propuesto.

Figura 3.31: Diagramas original y propuesto para generación del complejo $A_{12}A_5A_{16}$.

concentración de LIPE y el complejo mismo.

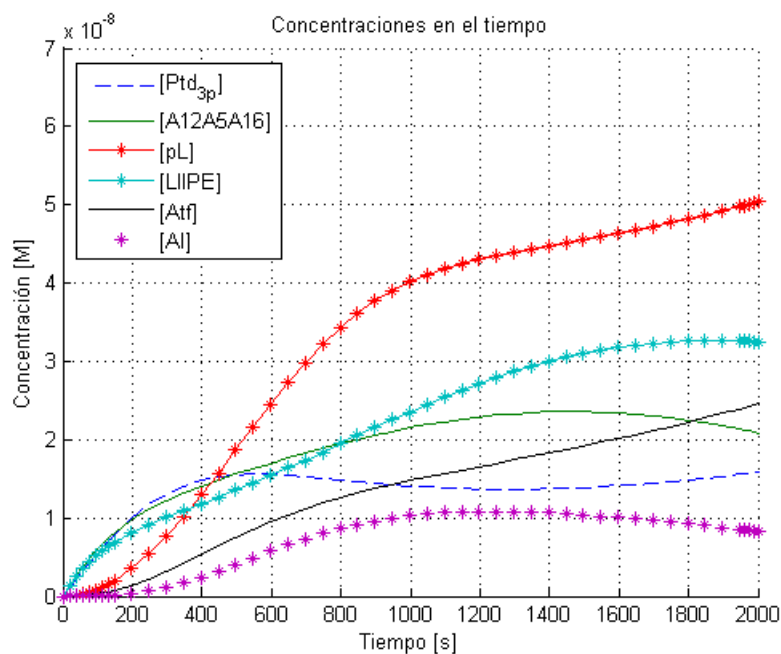


Figura 3.32: Simulación del modelo modificado. Donde P_p representa a PERK fosforilado, e_p al factor $eIF2\alpha$, Ptd_{3p} a PtdIns3P, A a las proteínas Atg con su correspondiente número, pL a proLC3, LIPE al complejo formado por LC3-II y PE, Atf al autofagosoma y Al al autolisosoma.

Sin embargo, estos cambios no afectan visiblemente a la formación y degradación del autolisosoma, por lo que se considera un cambio viable para futuros estudios del modelo.

Efecto de regulación

Con el objetivo de evaluar el funcionamiento del modelo, se procede a analizar los resultados del modelo con cambios en sus variables de entrada.

En primer lugar se procede a eliminar la presencia de estrés nutricional. Lo que debería inhibir la vía de producción de autofagosoma, tal como se muestra en la Figura 3.33.

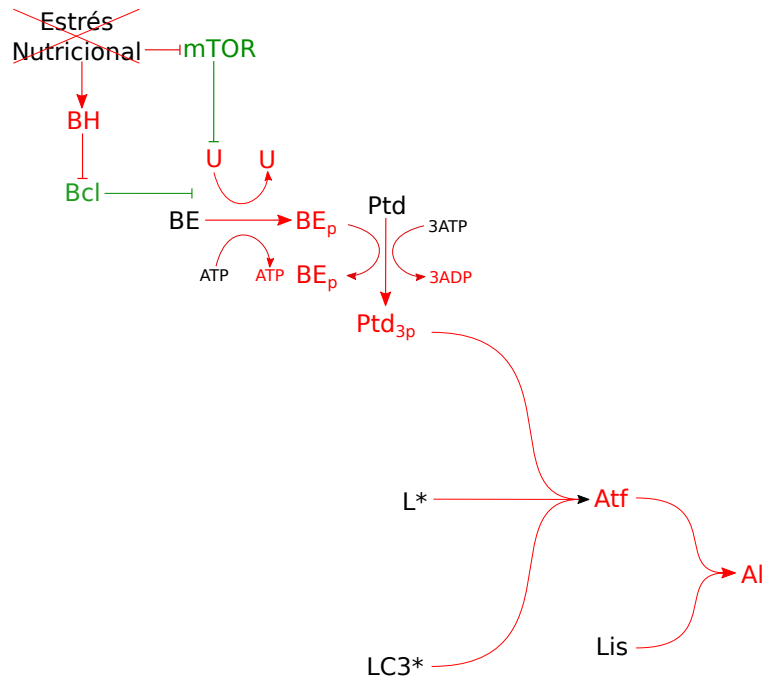


Figura 3.33: Diagrama del proceso, en rojo las vías y componentes inhibidos debido a la ausencia de estrés nutricional.

En efecto, en la Figura 3.34 se muestra la concentración de autofagosoma en 0. También se puede observar que el resto de vías no son afectadas.

Por otra parte, es posible analizar lo que sucede sin una concentración inicial de proteína mal plegada. Lo que debería provocar un cese de producción de autofagosoma y un efecto en la concentración de $LC3^*$.

En la Figura 3.35 es posible notar una concentración inicial de proteína mal plegada de 0. Sin embargo, aproximadamente a los 800 segundos se alcanza un máximo, esto debido a que por una parte se produce proteína mal plegada debido a la presencia de factor $eIF2\alpha$ y por otra se repliega debido a la acción de BiP.

Finalmente en la Figura 3.36 es posible observar que a pesar de no existir concentración inicial de proteína mal plegada, se produce LIIPE. Esto debido a la irreversibilidad de la fosforilación del factor $eIF2\alpha$. Se propone representar la reacción de forma reversible en un futuro enfoque.

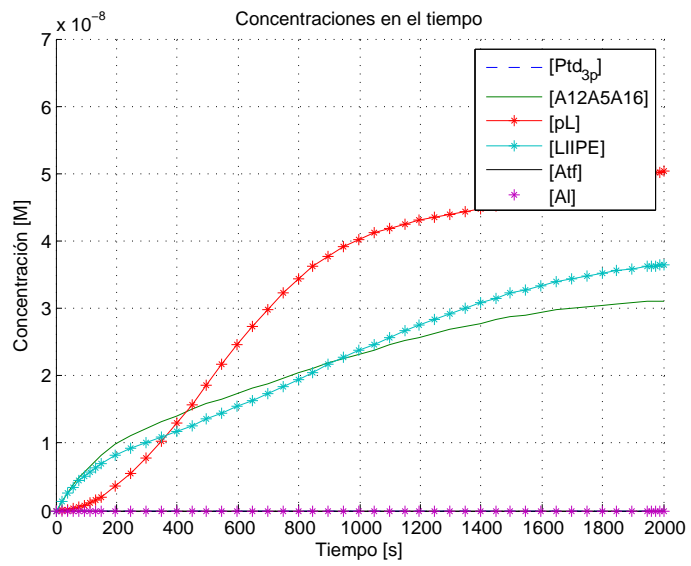


Figura 3.34: Simulación del modelo sin presencia de estrés.

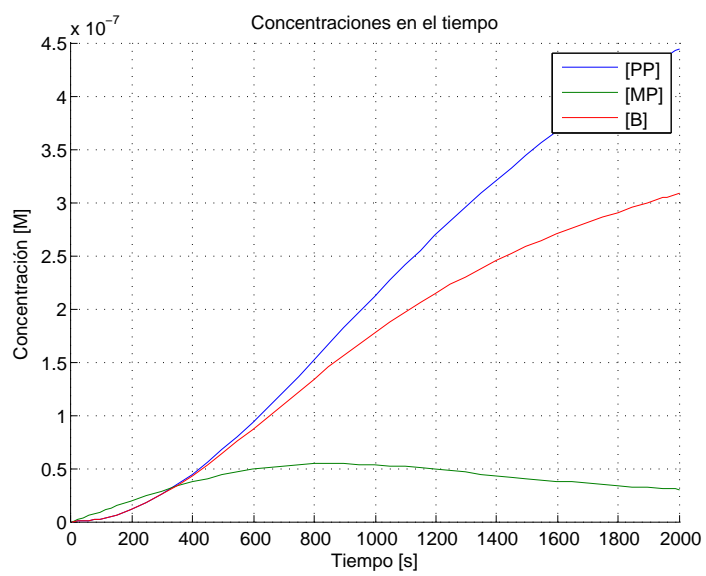


Figura 3.35: Simulación del modelo sin presencia de estrés y con concentración inicial de proteína mal plegada igual a 0.

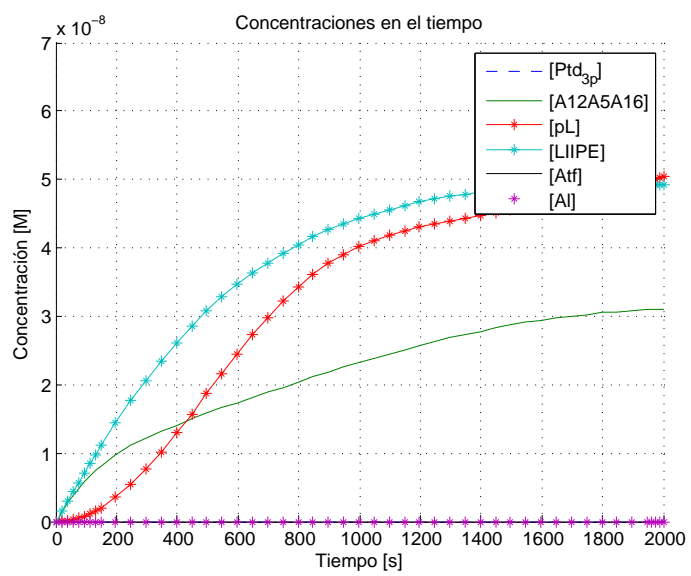


Figura 3.36: Simulación del modelo sin presencia de estrés y con concentración inicial de proteína mal plegada igual a 0.

3.4. Discusiones generales

A continuación se presentan breves discusiones generales y complementarias a lo anteriormente analizado.

Se observa que el mercado de producción en células animales es altamente competitivo. En este ambiente cobra importancia la tecnología como método de diferenciación. Esta logra que las empresas que inviertan en ella compitan con mayor ventaja y mantengan márgenes de utilidades mayores. Debido a esto y a las proyecciones del mercado de producción en células animales, se estima que puede existir un especial interés en mejorar las condiciones de cultivo.

Una herramienta útil para ello son los modelos, que tienen la capacidad de predecir el comportamiento que tendrían las células frente a ciertos cambios de sus componentes, pudiendo optimizar sus vías a un menor costo que realizando pruebas con alto componente azaroso. Es por ello que esta herramienta resulta atractiva para ayudar a aumentar la productividad de los procesos que involucren cultivo de células animales.

Las industrias y lugares donde se cultivan células para producción tienen como uno de sus objetivos reducir costos en sus procesos, es por esto que muchas veces mantienen condiciones bajas de nutrientes. Lo anterior genera mal plegamiento de proteínas e inhibición de reguladores. Es por ello que se eligió este estímulo como gatillante del modelo. Sin embargo, también existen otros factores que pueden desencadenar vías de degradación de proteínas, por ejemplo, problemas de aireación, déficit energético, entre otros. Se propone que, con el fin de robustecer el modelo, se agreguen estos estímulos iniciales en un futuro estudio.

Se enfatiza la importancia de tener un modelo de degradación vía lisosomal, ya que es una de las vías de degradación de agregados proteicos. Es por eso que cobra especial interés para áreas que trabajan con cepas recombinantes y productoras de grandes concentraciones de proteínas. Por otra parte, el modelo no solo ayuda a propiciar estas vías, sino que también cómo evitar que los agregados se degraden, en el caso de querer renaturar las proteínas mediante otro proceso.

El modelo planteado logra describir, a grandes rasgos, el comportamiento global de la degradación de proteínas mediante lisosoma. Sin embargo, posee ciertas dificultades que podrían ser abordadas en un siguiente estudio.

Una de las debilidades detectadas es que las proteínas reguladas, poseen términos asociadas a síntesis y no a degradación, por lo que en un largo plazo se acumularán en el sistema. Esto impide que la simulación sea extensa, es decir, acota su rango de acción y además produce una peor estimación de las concentraciones. Sin embargo, como primera aproximación simplifica el análisis, por lo que se propone estudiar los cambios que genera en el modelo y agregar estas dinámicas.

Por otra parte, como sistema de reconocimiento de proteína mal plegada, se planteó BiP como sensor, el que es inespecífico pero funciona de forma rápida. Este influye en la dinámica global al retrasar la degradación de los agregados, ya que repliega las proteínas antes de que formen esta estructura, disminuyendo así la concentración de proteína mal plegada (MP). Sin

embargo, para poder anclar MP a LC3 y así formar parte del autolisosoma, es necesario un marcaje previo de las proteínas, proceso no estudiado en este documento, pero importante pensando en la proyección del trabajo.

eIF2 α es un factor que participa en la síntesis global de proteínas, cuando es inhibido se frena la expresión de todas las proteínas, menos algunas que participan en la degradación proteica. En este trabajo, lo anteriormente descrito, se modeló con la generación de proteína mal plegada por parte del factor. A futuro se plantea mejorar esta aproximación, agregando una función que describa de mejor manera la dinámica del proceso y a su vez logre diferenciar el tipo de proteína que está generando (bien o mal plegada). A su vez, se propone la incorporación de algún elemento que active nuevamente al factor luego de la degradación proteica. De esta manera se podrá simular el proceso más allá de la degradación de las proteínas, con el objetivo de estudiar las dinámicas de la recuperación luego del estrés al que fueron sometidas las células.

Finalmente, el modelo planteado pretende ser una base para la formulación de modelos más específicos en la degradación proteica. Cada tipo de célula posee características diferentes, y por lo tanto es necesario ajustar los parámetros para satisfacer las necesidades particulares. Por otra parte, es necesario contar con datos experimentales para validar el modelo en cierto sistema biológico con ciertas células y en determinado proceso.

Capítulo 4

Conclusiones y proyecciones

El modelo planteado posee una larga lista de componentes analizados, los que logran describir en cierta medida el proceso de degradación de proteínas mediante lisosoma.

Se identifica que este modelo puede resultar útil para las industrias que producen mediante el cultivo de células animales, debido a que ayuda a generar estudios que optimicen sus procesos y ayuden a competir de mejor manera, aumentando el rango de utilidades. Además, en esta ocasión se estudia una vía poco explorada, que tiene relación con agregados proteicos, elementos presentes en cultivos con gran capacidad sintetizadora de proteínas.

Este estudio se enfoca en una importante condición de cultivo, la falta de nutrientes. Sin embargo, se propone tomar en cuenta en futuras instancias otras condiciones que pueden generar estrés en la célula y gatillar procesos de degradación, como lo son la falta de oxígeno y energía.

Las principales dificultades que posee el modelo son las expresiones descritas bajo modelos exponenciales, que poseen una alta tasa de crecimiento, lo que permite que la aplicabilidad del modelo se restrinja en tiempo, no pudiendo simular por más de 30 minutos aproximadamente. Por otra parte, se propone incluir fenómenos que permitan llevar las proteínas a su estado basal, con el fin de poder observar el comportamiento de las células post estrés.

Con el fin de simplificar el modelo se determinó no tomar en cuenta las dinámicas de síntesis y degradación de proteínas no reguladas, sin embargo, se propone que a futuro puedan ser estudiadas con el fin de obtener mayor exactitud en los resultados.

Por otra parte, se propone mejorar el modelo de inhibición de las moléculas Bcl-2 y BH3-only, ya que no logran describir el proceso planteado.

Por el contrario, se logran describir los procesos de reconocimiento de proteína mal plegada, fosforilación de PERK y $eIF2\alpha$, formación de membrana de autofagosoma y formación de vesículas.

Se concluye que al simular los subsistemas se obtienen resultados distintos a los encontrados al simular de forma global. Esto se produce porque al simular de forma separada no se

toman en cuenta los factores de interacción, estas interacciones producen que emerjan nuevas propiedades.

Dentro de las nuevas propiedades encontradas se observa que la degradación de proteínas vía lisosomal demora más tiempo en ejecutarse al interactuar con los procesos de replegamiento de proteínas (aproximadamente 10 minutos). Esto debido a que el proceso de replegamiento es más rápido, reduciendo la concentración de proteína mal plegada.

Finalmente se observa que este modelo es una base para la realización de modelos más específicos. Para esto es necesario contar con datos experimentales con el fin de ajustar los parámetros y validar los modelos.

Bibliografía

- [1] Gary Walsh. Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature biotechnology*, 32(10):992–1000, 2014.
- [2] Hirra Hussain, Rodrigo Maldonado-Agurto, and Alan J. Dickson. The endoplasmic reticulum and unfolded protein response in the control of mammalian recombinant protein production. *Biotechnology Letters*, 36(8):1581–1593, 2014.
- [3] Ratheesh Kumar R., Nagarajan N. S., Arunraj S. P., Devanjan Sinha, Vinoth Babu Veedin Rajan, Vinoth Kumar Esthaki, and Patrick D’Silva. HSPiR: a manually annotated heat shock protein information resource. *Bioinformatics*, 28(21):2853–2855, nov 2012.
- [4] William Blalock and Lucio Cocco. EIF2AK2 (eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2), 2012.
- [5] Richard J. Jackson, Christopher U. T. Hellen, and Tatyana V. Pestova. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(2):113–127, feb 2010.
- [6] Novus Biologicals. Autophagy and LC3.
- [7] Jens Füllgrabe, Daniel J. Klionsky, and Bertrand Joseph. The return of the nucleus: Transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1):65–74, 2014.
- [8] Yao Yao, Edith Jones, and Ken Inoki. Lysosomal Regulation of mTORC1 by Amino Acids in Mammalian Cells. *Biomolecules*, 2017.
- [9] Rebecca Marquez and Liang Xu. Autophagy-apoptosis toggle switch by Bcl-2:Beclin 1. *Am J Cancer Res*, 2(2):214–221, 2012.
- [10] Tassula Proikas-Cezanne, Zsuzsanna Takacs, Pierre Dönnes, and Oliver Kohlbacher. WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *Journal of cell science*, 128(2):207–17, jan 2015.
- [11] Kasper M.A. Rouschop, Twan van den Beucken, Ludwig Dubois, Hanneke Niessen, Johan Bussink, Kim Savelkoul, Tom Keulers, Hilda Mujcic, Willy Landuyt, Jan Willem Voncken, Philippe Lambin, Albert J. van der Kogel, Marianne Koritzinsky, and Bradley G. Wouters. The unfolded protein response protects human tumor cells during

- hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *Journal of Clinical Investigation*, 120(1):127–141, jan 2010.
- [12] Yukiko Kabeya, Noboru Mizushima, Akitsugu Yamamoto, Satsuki Oshitani-Okamoto, Yoshinori Ohsumi, and Tamotsu Yoshimori. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of cell science*, 117(Pt 13):2805–12, jun 2004.
- [13] Sarron Randall-Demllo, Marcello Chieppa, and Rajaraman Eri. Intestinal epithelium and autophagy: Partners in gut homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 4(SEP), 2013.
- [14] Florian M. Wurm. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 22(11):1393–1398, 2004.
- [15] George Lovrecz. Mammalian cell cultures. *Microbiology Australia*, pages 67–69, 2017.
- [16] A Anderson. Looking Ahead: Pharma Projections for 2016 - And Beyond, 2017.
- [17] Anne Richelle and Nathan Lewis. Improvements in protein production in mammalian cells from targeted metabolic engineering. *Systems Biology*, 2017.
- [18] Eriko Fujita, Yoriko Kouroku, Atsushi Isoai, Hiromichi Kumagai, Akifumi Misutani, Chie Matsuda, Yukiko K. Hayashi, and Takashi Momoi. Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: Ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Human Molecular Genetics*, 16(6):618–629, 2007.
- [19] Alba T. Macias, Douglas S. Williamson, Nicola Allen, Jenifer Borgognoni, Alexandra Clay, Zoe Daniels, Pawel Dokurno, Martin J. Drysdale, Geraint L. Francis, Christopher J. Graham, Rob Howes, Natalia Matassova, James B. Murray, Rachel Parsons, Terry Shaw, Allan E. Surgenor, Lindsey Terry, Yikang Wang, Mike Wood, and Andrew J. Massey. Adenosine-Derived Inhibitors of 78 kDa Glucose Regulated Protein (Grp78) ATPase: Insights into Isoform Selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(12):4034–4041, jun 2011.
- [20] Kurosh Ameri and Adrian Harris. ATF4 (activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)), 2009.
- [21] Daniel J Klionsky. Look people, .atg is an abbreviation for .autophagy-related”. That’s it. *Autophagy*, 8(9):1281–2, sep 2012.
- [22] Takahiro Shintani, Kuninori Suzuki, Yoshiaki Kamada, Takeshi Noda, and Yoshinori Ohsumi. Apg2p Functions in Autophagosome Formation on the Perivacuolar Structure. *Journal of Biological Chemistry*, 276(32):30452–30460, aug 2001.
- [23] John Kim, Wei-Pang Huang, and Daniel J. Klionsky. Membrane Recruitment of Aut7p in the Autophagy and Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathways Requires Aut1p, Aut2p, and the Autophagy Conjugation Complex. *The Journal of Cell Biology*, 152(1):51–64, jan 2001.

- [24] Chinatsu Otomo, Zoltan Metlagel, Giichi Takaesu, and Takanori Otomo. Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat Struct Mol Biol.*, 2013.
- [25] Fulvio Reggiori and Sharon A Tooze. Autophagy regulation through Atg9 traffic. *The Journal of cell biology*, 198(2):151–3, jul 2012.
- [26] Protein Data Bank. DNA damage-inducible transcript 3 protein - P35638 (DDIT3_HUMAN), 2017.
- [27] E. Y. W. Chan, A. Longatti, N. C. McKnight, and S. A. Tooze. Kinase-Inactivated ULK Proteins Inhibit Autophagy via Their Conserved C-Terminal Domains Using an Atg13-Independent Mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, 29(1):157–171, jan 2009.
- [28] Haijuan Yang, Derek G. Rudge, Joseph D. Koos, Bhamini Vaidialingam, Hyo J. Yang, and Nikola P. Pavletich. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*, 497(7448):217–223, may 2013.
- [29] Andrew M. Petros, Edward T. Olejniczak, and Stephen W. Fesik. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1644(2-3):83–94, mar 2004.
- [30] Elena Lomonosova and G Chinnadurai. BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *National Institute of health*, 2008.
- [31] Adam Oberstein, Philip D Jeffrey, and Yigong Shi. Crystal Structure of the Bcl-X L -Beclin 1 Peptide Complex BECLIN 1 IS A NOVEL BH3-ONLY PROTEIN *. 2007.
- [32] Jonathan M. Backer. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochemical Journal*, 410(1):1–17, feb 2008.
- [33] Andrea Elizabeth Rodríguez Villarroel. Estrés de retículo endoplásmico : una nueva vía para activar la autofagia mediada por chaperona. 2008.
- [34] Monika Kusio-Kobińska, Paulina Podsiadłowa-Bartnicka, Philippos Peidis, Eliza Glodkowska-Mrowka, Kamila Wolanin, Grzegorz Leszak, Ilona Seferyńska, Tomasz Stokłosa, Antonis E Koromilas, and Katarzyna Piwocka. The PERK-eIF2 α phosphorylation arm is a pro-survival pathway of BCR-ABL signaling and confers resistance to imatinib treatment in chronic myeloid leukemia cells. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(21):4069–78, nov 2012.
- [35] Vojo Deretic, Tatsuya Saitoh, and Shizuo Akira. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 13(10):722–737, sep 2013.
- [36] Michal Ronen, Revital Rosenberg, Boris I Shraiman, and Uri Alon. Assigning numbers to the arrows: Parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *National Academy of Sciences*, 2013.
- [37] Katie R. Martin, Dipak Barua, Audra L. Kauffman, Laura M. Westrate, Richard G.

- Posner, William S. Hlavacek, and Jeffrey P. MacKeigan. Computational model for autophagic vesicle dynamics in single cells. *Autophagy*, 2013.
- [38] Jeremy M. (Jeremy Mark) Berg, John L. Tymoczko, Lubert. Stryer, and Lubert. Stryer. *Biochemistry*. W.H. Freeman, 2002.
- [39] Jun Hoe Kim, Seung Beom Hong, Jae Keun Lee, Sisu Han, Kyung-Hye Roh, Kyung-Eun Lee, Yoon Ki Kim, Eui-Ju Choi, and Hyun Kyu Song. Insights into autophagosome maturation revealed by the structures of ATG5 with its interacting partners. *Autophagy*, 2015.
- [40] Ziad M Eletr, Danny T Huang, David M Duda, Brenda A Schulman, and Brian Kuhlman. E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(10):933–934, oct 2005.
- [41] Petter Björquist and Stig Boström. DETERMINATION OF THE KINETIC CONSTANTS OF TISSUE FACTOR/FACTOR VII/FACTOR VIIA AND ANTITHROMBIN/HEPARIN USING SURFACE PLASMON RESONANCE. *Thrombosis Research*, 85(3):225–236, feb 1997.
- [42] Do Hoon Kwon, Sulhee Kim, Yang Ouk Jung, Kyung-Hye Roh, Leehyeon Kim, Byeong-Won Kim, Seung Beom Hong, In Young Lee, Ju Han Song, Woo Cheol Lee, Eui-Ju Choi, Kwang Yeon Hwang, and Hyun Kyu Song. The 1:2 complex between RavZ and LC3 reveals a mechanism for deconjugation of LC3 on the phagophore membrane. 2017.
- [43] Danilo Roberto Diedrichs. A mathematical model of the unfolded protein response to stress in the endoplasmic reticulum of mammalian cells. pages 1–166, 2012.
- [44] Jennifer A. Nelson, Irina Shepotinovskaya, and Olke C. Uhlenbeck. Hammerheads Derived from sTRSV Show Enhanced Cleavage and Ligation Rate Constants. *Biochemistry*, 44(44):14577–14585, nov 2005.
- [45] Jueyang Wei and Linda M Hendershot. Characterization of the Nucleotide Binding Properties and ATPase Activity of Recombinant Hamster BiP Purified from Bacteria*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995.
- [46] Lewis J Kraft, Pallavi Manral, Jacob Dowler, and Anne K Kenworthy. Nuclear LC3 associates with slowly diffusing complexes that survey the nucleolus HHS Public Access. *Traffic*, 17(4):369–399, 2016.
- [47] Paramita Saha, Camelia Manna, Jaydeb Chakrabarti, and Mahua Ghosh. Reversible thermal unfolding of a yfdX protein with chaperone-like activity. *Scientific Reports*, 6(June):1–10, 2016.
- [48] Ming Yan, Juanjuan Du, Zhen Gu, Min Liang, Yufang Hu, Wenjun Zhang, Saul Price-man, Lily Wu, Z. Hong Zhou, Zheng Liu, Tatiana Segura, Yi Tang, and Yunfeng Lu. A novel intracellular protein delivery platform based on single-protein nanocapsules. *Nature Nanotechnology*, 5(1):48–53, jan 2010.

- [49] José Manuel Zamudio-arroyo, María Teresa Peña-Rangel, and Juan Rafael Riesgo-Escovar. La ubiquitinación: un sistema de regulación dinámico de los organismos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2):133–141, 2012.
- [50] Vikram Singh and Pawan K. Dhar. *Systems and synthetic biology*. Springer, 2015.

Anexo A

Memoria de cálculos

A.1. Reacciones

A continuación se presentan las reacciones consideradas en el modelo, las que son la base para el planteamiento de las ecuaciones que describirán el comportamiento del sistema.

A.1.1. Reconocimiento proteína mal plegada

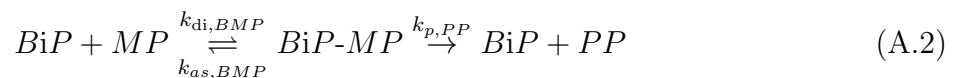
Disociación de BIP-PERK

El complejo BiP-PERK es un factor importante en el reconocimiento de proteínas mal plegadas. Este complejo se asocia y disocia reversiblemente, tendiendo a mantener su forma conjugada (ver Reacción A.1).



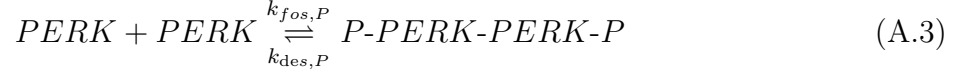
Unión BiP-Proteína

Cuando BiP no se encuentra formando complejo con PERK, puede ejercer su rol de chaperona, asociándose reversiblemente a proteínas con errores estructurales para posteriormente replegarlas (ver Reacción A.2).



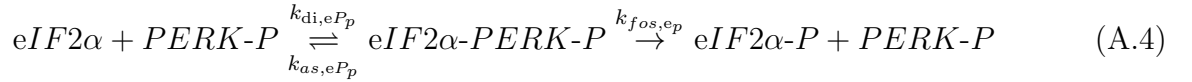
Autofosforilación

La proteína PERK en su forma no conjugada puede dimerizarse y autofosforilarse, tal como se representa en la Reacción A.3.



Fosforilación de $eIF2\alpha$

El dímero PERK fosforilado actúa como una enzima kinasa, fosforilando al factor $eIF2\alpha$, acción representada en la Reacción A.4.



A.1.2. Producción de proteína

En este modelo se plantea que la producción de proteínas está determinada por la presencia del factor $eIF2\alpha$, debido a que éste es el encargado de comenzar el proceso de traducción de proteínas en el ribosoma. La producción será solo de proteína mal plegada, debido a que la concentración de proteína no afecta a la dinámica de ninguna reacción. Por otra parte, se toma el supuesto de que la traducción de proteína mal plegada no afecta la concentración del factor $eIF2\alpha$. Solo se ve afectada la dinámica de traducción de proteína mal plegada por la presencia del factor (ver Reacción A.5).



A.1.3. Regulación traducción

Regulación ATF4

El factor $eIF2\alpha$, fosforilado por la acción de PERK, inhibe la traducción global, estimulando a su vez la producción de la proteína ATF4. Se asume que mRNAatf4 se encuentra en exceso, por lo que no se considera en la reacción (ver Reacción A.6).



A.1.4. Regulación transcripción

La proteína ATF4 actúa como un estimulador de la transcripción de una serie de proteínas relevantes para la degradación de proteínas vía autolisosoma, entre ellas se destacan Atg12, proLC3 y CHOP, representadas en las Reacciones A.7, A.8 y A.9.



A su vez, CHOP (proteína transcrita por la acción de ATF4) estimula la transcripción de BH3-only. Proteína asociada al proceso de nucleación (ver Reacción A.10).

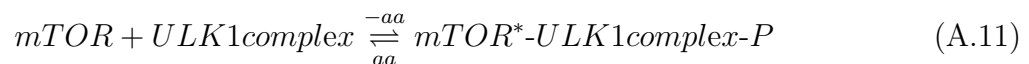
Regulación de BH3-only



A.1.5. Formación de membrana de autofagosoma

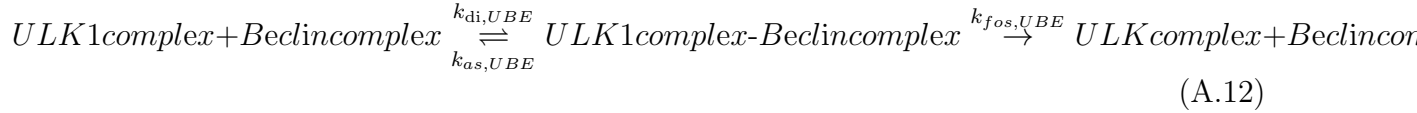
Activación de mTOR

mTOR es activada por la presencia de ciertos aminoácidos, cuando esta proteína se encuentra activa ($mTOR^*$) inhibe la acción de el complejo ULK1, esto lo hace mediante la fosforilación de dicho complejo. Lo contrario ocurre bajo escasez de aminoácidos, mTOR se inactiva, ULK1 se desfosforila y se propicia la formación de autofagosoma (ver Reacción A.11).



Activación de complejo Beclin

Cuando mTOR es inactivado, el complejo ULK1 funciona como kinasa, fosforilando la proteína Beclin (ver Reacción A.12).



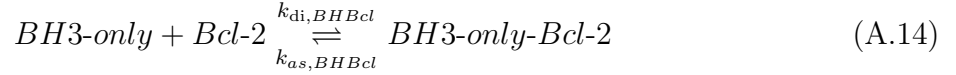
Inhibición de complejo Beclin

Beclin también puede verse inhibida, esto ocurre por la unión covalente reversible de Bcl-2 (ver Reacción A.13).



Inhibición de Bcl-2

BH3-only al unirse covalentemente con el inhibidor Bcl-2 impide su acción, activando de este modo la formación del autofagosoma (ver Reacción A.14).



Generación de PtdIns3P

El complejo Beclin activado actúa fosforilando el lípido PtdIns, formando de este modo PtdIns3P, elemento promordial en la formación de la membrana del autofagosoma (ver Reacción A.15).



Activación de LC3

Los procesos involucrados en la activación de LC3 son similares a los utilizados para la ubiquitinación: activación, conjugación, ligación, elongación y desubiquitinización. Los tres primeros procesos son conocidos como E1, E2 y E3 respectivamente [49].

Las enzimas E1 hidrolizan ATP y adenilan el extremo C-terminal de la ubiquitina. Esto genera la formación de un enlace tioéster entre el extremo C-terminal de la ubiquitina y el sitio activo de la enzima [49].

En la etapa de conjugación, la ubiquitina se transfiere al sitio activo de una enzima E2 donde está unida por otro enlace tioéster a un residuo de cisteína en el sitio activo de la enzima [49].

El proceso de ligación consta del traspaso de la ubiquitina desde la enzima E2 a un residuo de lisina de la proteína sustrato [49].

Para la activación de LC3 participan enzimas con funciones análogas a E1, E2 y E3, pero con sustratos diferentes (no ubiquitina). Estas proteínas serán denominadas de esta forma por efectos prácticos.

La primera etapa consta de la formación del complejo Atg12-Atg5, para esto el dímero Atg7 (con función E1) se une a Atg12 adenilando su extremo C-terminal y formando un enlace tioéster. Atg12 adenilado es traspasado a Atg10 (función E2) formando un nuevo enlace tioéster, de esta forma se propicia la unión covalente a Atg5 y no covalente con Atg16. Este complejo forma un tetrámero y actuará más tarde sobre LC3-I (ver Figura A.1 y Reacciones A.16,A.17, A.18, A.19 y A.20) [7, 13].

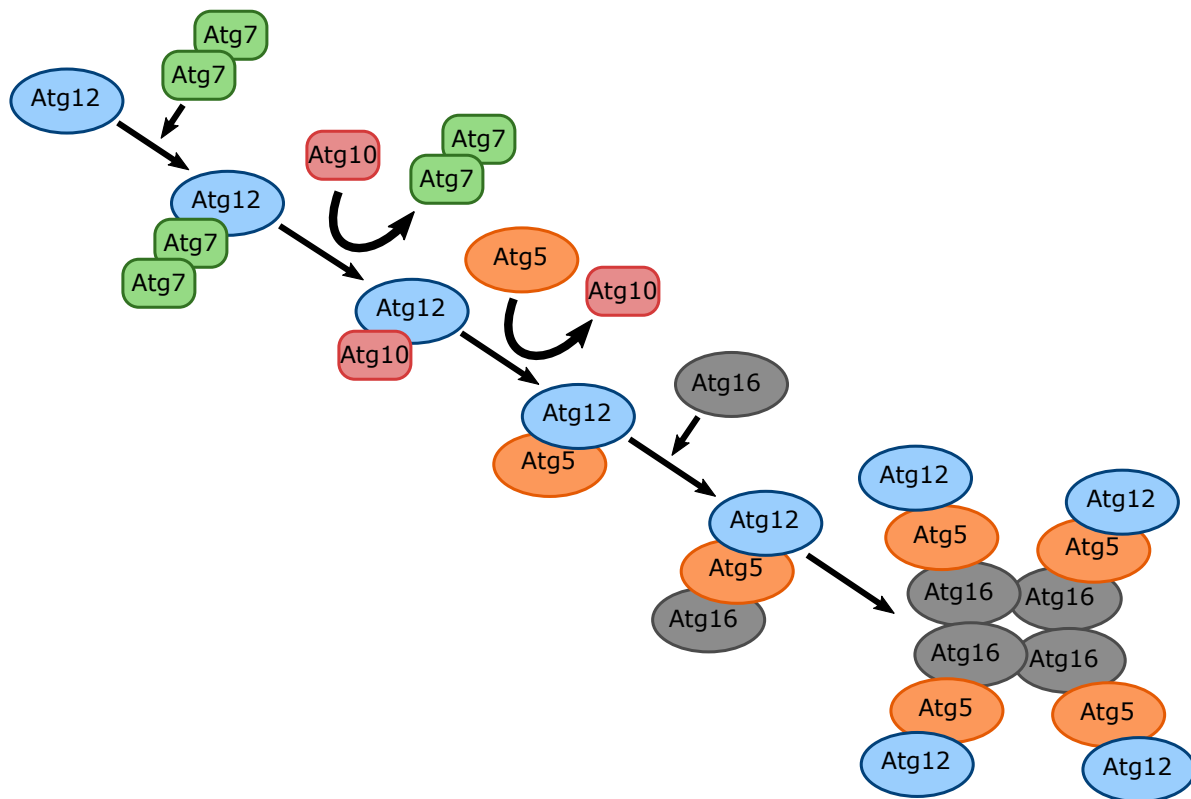
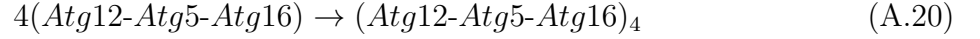
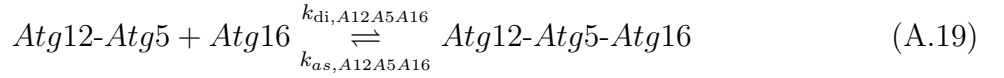
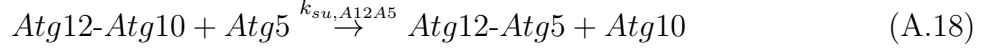
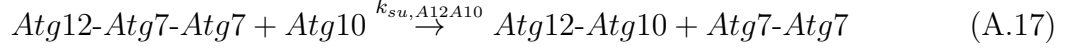
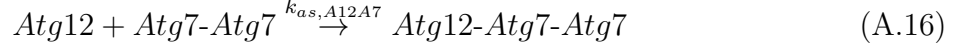
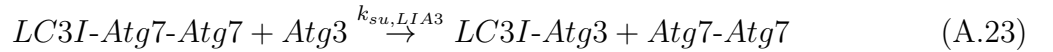
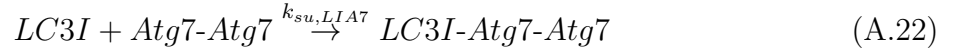
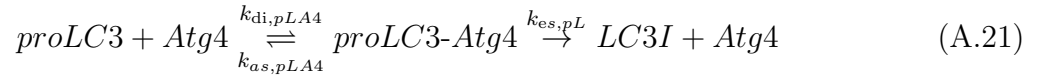


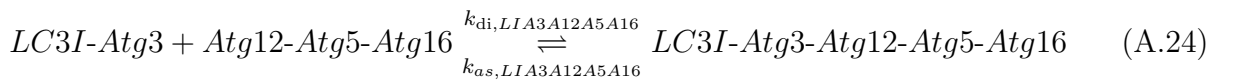
Figura A.1: Atg12 se conjuga con Atg5 y Atg16 mediante una serie de procesos mediados por enzimas con actividad análogo a E1 y E2, para finalmente formar un tetrámero con actividad E3. Adaptada de Randall-Demllo et all [13].



La segunda etapa corresponde a la lipidiación de LC3. Para esto es necesario escindir la pro-LC3 por medio de la acción de Atg4. Posteriormente la enzima Atg7 se une a LC3-I mediante enlace tioéster, preparándola para su reemplazo por la enzima de acción E2 Atg3 (ver Reacciones A.21, A.22 y A.23) [7].



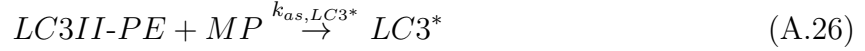
Es en esta etapa donde el complejo Atg12-Atg5-Atg16 cumple la acción de enzima E3, fomentando la unión de LC3-I con el lípido PE, tal como se muestra en las Reacciones A.24 y A.25 [7].



Secuestro se proteínas mal plegadas

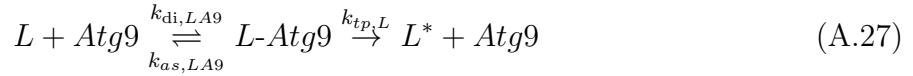
LC3-II posee una función en el reconocimiento de carga. El secuestrosoma 1 (SQSTM1) interactúa con proteínas ubiquitinadas en organelos o patógenos invasores. El complejo MP-SQSTM1 se une selectivamente al autofagosoma mediante la interacción de SQSTM1 con LC3-II [7].

Esto se representa mediante la Reacción A.26, donde $LC3^*$ representa a LC3 activo en su forma LC3-II lipidado y unido a la proteína mal plegada a degradar.



Transporte de lípidos

La proteína transmembrana Atg9 transporta los lípidos requeridos para la elongación del autofagosoma. Esta acción se ve representada en la Reacción A.27, donde L simboliza los lípidos en vesículas post Golgi y L^* los lípidos transportados al omegasoma.



Elongación de membrana de autofagosoma

Para terminar la formación del autofagosoma es necesario contar con los lípidos transportados al omegasoma, PtdIns3P (el que genera el acople de una serie de proteínas) y LC3 acoplado a proteína mal plegada. De bibliografía se extrae que para la obtención de una vesícula se necesitan 30 proteínas Atg9, las que transportan un set de lípidos cada una [24]. A su vez, es necesaria la presencia de 400 proteínas LC3 activadas y lipidadas para la formación del autofagosoma [36]. Por otra parte, se asume que se necesita la misma proporción de PtdIns3P que de lípidos. De esta forma el proceso se representa mediante la Reacción A.28.



A.1.6. Formación de autolisosoma

Fusión de autofagosoma y lisosoma

Para la formación del autolisosoma, es necesaria la fusión del autofagosoma y lisosoma. Esta acción se representa mediante la Reacción A.29.



A.1.7. Degradación

Para la degradación de las proteínas se tomará como supuesto que todo el material es degradado a unidades básicas, las que no son recicladas en el proceso. De esta forma se plantea la Reacción A.30.



A.2. Ecuaciones

A.2.1. Complejo BiP proteína mal plegada

Proteína total conservada

Se asume que la concentración total de BiP (BiP^{tot}) se mantiene siempre constante, considerando tanto su estado en complejo como libre, tal como lo muestra la Ecuación A.1.

$$B^{tot} = \text{constante} \quad (\text{A.1})$$

Cantidad de BiP

Se ha estudiado que la chaperona BiP es altamente abundante en el ER. Esta puede estar presente tanto libre como en complejo con diferentes proteínas. La concentración de BiP libre y acoplada a proteína mal plegada es ordenes de magnitud superior a la concentración de BiP unida a PERK, debido a esto es posible despreciar este factor en la Reacción de proteína total (ver Ecuación A.2) [43].

$$B^{tot} = B + BMP + BP \approx B + BMP \quad (\text{A.2})$$

Quasi estado estacionario

La disociación de BiP y PERK, y su posterior unión a proteína mal plegada es un proceso rápido, en comparación con el total de la respuesta UPR (minutos versus horas). Debido a esto se pueden asumir supuestos de estado quasi estacionario (ver Ecuación A.3) [43].

$$\frac{dBP}{dt} = \frac{dBMP}{dt} = 0 \quad (\text{A.3})$$

Se establecen las constantes k_1 y k_{-1} para la reacción reversible y k para la reacción irreversible, de esta forma la cinética de la formación de BMP se describe de la siguiente forma:

$$\begin{aligned} \frac{dBMP}{dt} &= -k(BMP) - k_{-1}(BMP) + k_1(B)(MP) = 0 \\ &- (k + k_{-1})(BMP) + k_1(B)(MP) = 0 \end{aligned} \quad (\text{A.4})$$

Considerando la Ecuación A.2 y reemplazando B en la Ecuación A.4, Queda la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} -(k + k_{-1})(BMP) + k_1(B^{tot} - BMP)(MP) &= 0 \\ (k + k_{-1})(BMP) + k_1(BMP)(MP) &= k_1(B^{tot})(MP) \\ (BMP) &= \frac{k_1(B^{tot})(MP)}{k + k_{-1} + k_1(MP)} \\ (BMP) &= \frac{(B^{tot})(MP)}{\frac{k+k_{-1}}{k_1} + (MP)} \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

Se define $\frac{k+k_{-1}}{k_1}$ como K_B . Reemplazando en la Ecuación A.5, queda la siguiente ecuación:

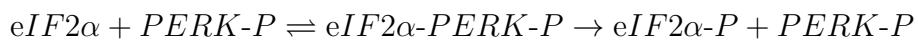
$$(BMP) = \frac{(B^{tot})(MP)}{K_B + (MP)} \quad (\text{A.6})$$

Finalmente, al multiplicar por k se obtiene la siguiente ecuación:

$$V_{BMP} = \frac{(V_{max}^B)(MP)}{K_B + (MP)} \quad (\text{A.7})$$

A.2.2. Fosforilación de eIF2 α

PERK fosforilada cumple un rol de enzima kinasa con eIF2 α . Si se aprecia la forma de acción de la enzima mostrada en la sección anterior se puede ver que posee una forma análoga a la formación de proteína plegada correctamente:



Tomando supuestos análogos al análisis de BiP y MP:

- $P_p^{tot} = constante$
- $P_p^{tot} = P_p + eP_p$
- $\frac{deP_p}{dt} = 0$

Queda la siguiente ecuación que se utilizará en el modelo:

$$V_{eP_p} = \frac{(V_{max}^{P_p})(e)}{K_{P_p} + (e)} \quad (A.8)$$

A.2.3. Fosforilación del complejo Beclin

Este proceso se modela como una reacción del tipo Michaelis Menten, por lo que bajo los mismos supuestos que los casos anteriores, queda la siguiente expresión:

$$V_{UBE} = \frac{(V_{max}^U)(BE)}{K_U + (BE)} \quad (A.9)$$

A.2.4. Fosforilación de PtdIns

Analogamente a los casos anteriores y bajo los mismos supuestos, se modela la reacción mediante Michaelis Menten, resultando la siguiente expresión:

$$V_{PtdBE_p} = \frac{(V_{max}^{BE_p})(Ptd)}{K_{BE_p} + (Ptd)} \quad (A.10)$$

A.2.5. Escisión de proLC3

Este procedimiento es análogo a los anteriormente descritos, de esta forma se obtiene la siguiente expresión:

$$V_{pLA4} = \frac{(V_{max}^{A4})(pL)}{K_{A4} + (pL)} \quad (A.11)$$

A.2.6. Transporte de lípidos

Utilizando la misma metodología que en los otros casos, se asume un comportamiento de Michaelis Menten, de esta forma se obtiene la siguiente expresión:

$$V_{LA9} = \frac{(V_{max}^{A9})(L)}{K_{A9} + (L)} \quad (\text{A.12})$$

A.2.7. Promotor de transcripción

Se denomina D al sitio de unión del promotor X en el ADN. Asociación descrita por la Ecuación A.13, donde K_f representa la velocidad de asociación y K_b la de disociación [50].



Por conservación de masa, se tiene que:

$$D^{tot} = D + XD \quad (\text{A.14})$$

Por otra parte la cinética de formación del complejo sigue la siguiente forma:

$$\frac{dXD}{dt} = K_f[X][D] - K_b[XD]$$

Asumiendo estado estacionario y definiendo K_d como el producto de K_f y K_b , se obtiene la Ecuación.

$$K_d = \frac{[X][D]}{[XD]} \quad (\text{A.15})$$

Al reemplazar D, desde la Ecuación A.14 en la Ecuación A.15 y despejar, se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{[XD]}{[D^{tot}]} = \frac{[X]}{K_d + [X]}$$

Donde $\frac{[XD]}{[D^{tot}]}$ representa la probabilidad de que el promotor esté unido al sitio D. Este elemento es el que otorga la velocidad de producción de mRNA, definiendo β como la velocidad máxima de transcripción (ver Ecuación A.16).

$$\frac{dmRNA}{dt} = \beta \frac{[XD]}{[D^{tot}]} = \beta \frac{[X]}{K_d + [X]} \quad (\text{A.16})$$

Finalmente, se asume que no existe el fenómeno de cooperatividad en la acción de los promotores de transcripción, por lo que la velocidad de transcripción se ve subestimada en este modelo.

Anexo B

Organización y valores de los componentes del modelo

B.1. Variables y parámetros

El modelo presentado consta con variados componentes, los que son en primera instancia divididos en variables (Tabla B.1) y parámetros (Tabla B.2)

Tabla B.1: Variables del modelo de degradación de proteínas.

Variables
A10
a12
A12
A12A10
A12A5
A12A5A16
A12A7
A16
A3
A4
A5
A7
A9
AF4
Al
Atf
B
Bcl
Sigue a continuación

Tabla B.1: Variables del modelo de degradación de proteínas (continuación)

Variables (cont.)
BE
BE_p
BEBcl
bh
BH
BH
BHBcl
BHBcl
BMP
BP
c
C
e
e_p
eP_p
L
L^*
LA9
$LC3^*$
LI
LIA3
LIA3A12A5A16
LIA7
LIPE
Lis
MP
P
P_p
PE
pl
pL
pLA4
PP
Ptd
Ptd_{3p}
$PtdBE_p$
U
UBE

Tabla B.2: Parámetros del modelo de degradación de proteínas.

Parámetros
β_{a12}
β_{bh}
β_c
β_{pl}
$A4^{tot}$
$A9^{tot}$
B^{tot}
BE_p^{tot}
$k_{as,A12A5A16}$
$k_{as,A12A7}$
$k_{as,BEBcl}$
$k_{as,BHBcl}$
$k_{as,BMP}$
$k_{as,BP}$
k_{as,eP_p}
$k_{as,LA9}$
$k_{as,LC3^*}$
$k_{as,LIA3A12A5A16}$
$k_{as,LIA7}$
$k_{as,pLA4}$
$k_{as,PtdBE_p}$
$k_{as,UBE}$
$k_{d,Al}$
$k_{des,P}$
$k_{di,A12A5A16}$
$k_{di,BEBcl}$
$k_{di,BMP}$
$k_{di,BP}$
k_{di,eP_p}
$k_{di,LA9}$
$k_{di,LIA3A12A5A16}$
$k_{di,pLA4}$
$k_{di,PtdBE_p}$
$k_{di,UBE}$
$k_{es,pL}$
$k_{fc,Al}$
$k_{fc,Atf}$
k_{fos,BE_p}
k_{fos,e_p}
$k_{fos,P}$
Sigue a continuación

Tabla B.2: Parámetros del modelo de degradación de proteínas (continuación)

Parámetros (cont.)
$k_{fos,Ptd3p}$
$k_{p,PP}$
$k_{su,A12A10}$
$k_{su,A12A5}$
$k_{su,LIA3}$
$k_{su,LIA7}$
$k_{su,LIIPE}$
$k_{su,LIPE}$
$k_{td,A12}$
$k_{td,AF4}$
$k_{td,BH}$
$k_{td,C}$
$k_{td,MP}$
$k_{td,pL}$
$k_{tp,L}$
K_{A4}
K_{A9}
K_B
K_{BE_p}
$K_{d,a12}$
$K_{d,bh}$
$K_{d,c}$
$K_{d,pl}$
K_{P_p}
K_U
P_p^{tot}
U^{tot}

B.2. Clasificación de parámetros

Los parámetros mostrados en la Tabla B.2 se obtienen a partir de una búsqueda bibliográfica. La metodología de búsqueda se basa en agrupar los parámetros bajo distintos criterios, buscando encontrar cualidades y características afines entre ellos. La primera clasificación se puede ver en la Tabla B.3.

Tabla B.3: Agrupación y clasificación de los parámetros a utilizar en el modelo debido a la función que acompaña.

Parámetros	Clasificación
β_{a12}	Velocidad máxima de transcripción
β_{bh}	
β_c	
β_{pl}	
$A4^{tot}$	Cantidad total de proteína
$A9^{tot}$	
B^{tot}	
BE_p^{tot}	
P_p^{tot}	
U^{tot}	
K_{A4}	Concentración donde se alcanza la mitad de la velocidad máxima de formación de producto
K_{A9}	
K_B	
K_{BE_p}	
K_{P_p}	
K_U	
$k_{as,A12A5A16}$	Constantes cinéticas de asociación a un complejo
$k_{as,A12A7}$	
$k_{as,BEBcl}$	
$k_{as,BHBcl}$	
$k_{as,BMP}$	
$k_{as,BP}$	
k_{as,eP_p}	
$k_{as,LA9}$	
$k_{as,LC3^*}$	
$k_{as,LIA3A12A5A16}$	
$k_{as,LIA7}$	
$k_{as,pLA4}$	
$k_{as,PtdBE_p}$	
$k_{as,UBE}$	
$k_{di,A12A5A16}$	Constantes cinéticas de disociación de un complejo
$k_{di,BEBcl}$	
Sigue a continuación	

Tabla B.3: Agrupación y clasificación de los parámetros a utilizar en el modelo debido a la función que acompaña (continuación)

Parámetros	Clasificación (cont.)
$k_{di,BMP}$	
$k_{di,BP}$	
k_{di,eP_p}	
$k_{di,LA9}$	
$k_{di,LIA3A12A5A16}$	
$k_{di,pLA4}$	
$k_{di,PtdBE_p}$	
$k_{di,UBE}$	
$k_{d,a12}$	Constantes cinéticas de degradación de un componente
$k_{d,Al}$	
$k_{d,bh}$	
$k_{d,c}$	
$k_{d,pl}$	
$k_{des,P}$	Constante cinética de desfosforilación
$k_{es,pL}$	Constante cinética de escisión
$k_{fc,Al}$	Constantes cinéticas de formación de vesícula
$k_{fc,Atf}$	
k_{fos,BE_p}	Constantes cinéticas de fosforilación
k_{fos,e_p}	
$k_{fos,P}$	
$k_{fos,Ptd3p}$	
$k_{p,PP}$	Constantes de producción de un componente
$k_{su,A12A10}$	Constantes cinéticas de sustitución de un componente
$k_{su,A12A5}$	
$k_{su,LIA3}$	
$k_{su,LIA7}$	
$k_{su,LIPE}$	
$k_{su,LIPE}$	
$k_{td,A12}$	Constantes cinéticas del proceso de traducción
$k_{td,AF4}$	
$k_{td,BH}$	
$k_{td,C}$	
Sigue a continuación	

Tabla B.3: Agrupación y clasificación de los parámetros a utilizar en el modelo debido a la función que acompaña (continuación)

Parámetros	Clasificación (cont.)
$k_{td,MP}$	Constante cinética de transporte de lípidos
$k_{td,pL}$	
$k_{tp,L}$	

B.3. Valores de parámetros

En la Tabla B.4 se muestran los valores que toman todas las variables del modelo, se sigue la clasificación mostrada en la Tabla B.3.

Tabla B.4: Valores utilizados en la simulación del modelo propuesto.

Tipo	Parámetro	Literatura	Simulación	Unidad
Velocidad máxima de transcripción	β_{a12}	$2,2 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^{-7}$	$M s^{-1}$
	β_{bh}	$2,2 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^{-7}$	$M s^{-1}$
	β_c	$2,2 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^{-7}$	$M s^{-1}$
	β_{pl}	$2,2 \cdot 10^3$	$2,2 \cdot 10^{-7}$	$M s^{-1}$
Cantidad total de proteína	$A4^{tot}$	$6 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	M
	$A9^{tot}$	$6 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	M
	B^{tot}	$6 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	M
	BE_p^{tot}	$6 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	M
	P_p^{tot}	$6 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	M
	U^{tot}	$6 \cdot 10^{-7}$	$6 \cdot 10^{-7}$	M
Concentración donde se alcanza la mitad de la velocidad máxima de formación de producto	K_{A4}	$5 \cdot 10^{-6}$	$4,5 \cdot 10^{-7}$	M
	K_{A9}	10^{-5}	10	M
	K_B	$7 \cdot 10^{-7}$	$7 \cdot 10^{-7}$	M
	K_{BE_p}	$2 \cdot 10^{18}$	10	M
	K_{P_p}	$2 \cdot 10^{18}$	10	M
	K_U	$2 \cdot 10^{18}$	$1 \cdot 10^{-1}$	M
	$k_{d,a12}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	$6,6 \cdot 10^{-15}$	M
	$k_{d,bh}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	$6,6 \cdot 10^{-15}$	M
	$k_{d,c}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	$6,6 \cdot 10^{-15}$	M
	$k_{d,pl}$	$6,6 \cdot 10^{-5}$	$6,6 \cdot 10^{-15}$	M

Sigue a continuación

Tabla B.4: Valores utilizados en la simulación del modelo propuesto (continuación)

Tipo	Parámetro	Literatura	Simulación	Unidad
Constantes cinéticas de asociación a un complejo	$k_{as,A12A5A16}$	$7,6 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^4$	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{as,A12A7}$	$8 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^4$	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{as,BHBcl}$	1	1	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{as,BEBcl}$	1	1	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{as,BMP}$	10^4	10^4	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{as,BP}$	10^4	10^4	$M^{-1} s^{-1}$
	k_{as,eP_p}	$5,5 \cdot 10^{-19}$	10^3	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{as,LA9}$	10^4	10^4	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{as,LC3^*}$	10^4	$8 \cdot 10^3$	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{as,LIA3A12A5A16}$	10^4	10^4	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{as,LIA7}$	$8 \cdot 10^{-1}$	$8 \cdot 10^3$	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{as,pLA4}$	$2 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^4$	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{as,PtdBE_p}$	$5,5 \cdot 10^{-19}$	$1 \cdot 10^3$	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{as,UBE}$	$5,5 \cdot 10^{-19}$	$1 \cdot 10^3$	$M^{-1} s^{-1}$
Constante cinética de degradación	$k_{d,Al}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$6,6 \cdot 10^{-15}$	s^{-1}
Constante cinética de desfosforilación	$k_{des,P}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$M^{-1} s^{-1}$
Constantes cinéticas de disociación de un complejo	$k_{di,A12A5A16}$	$5,2 \cdot 10^{-3}$	$5,2 \cdot 10^{-3}$	s^{-1}
	$k_{di,BEBcl}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	s^{-1}
	$k_{di,BHBcl}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	s^{-1}
	$k_{di,BMP}$	10^{-5}	10^{-5}	s^{-1}
	$k_{di,BP}$	10^{-5}	10^{-5}	s^{-1}
	k_{di,eP_p}	$1 \cdot 10^{-1}$	$5,5 \cdot 10^{-5}$	s^{-1}
	$k_{di,LA9}$	$1 \cdot 10^{-1}$	$5,5 \cdot 10^{-5}$	s^{-1}
	$k_{di,LIA3A12A5A16}$	10^{-5}	10^{-5}	s^{-1}
	$k_{di,pLA4}$	10^{-5}	10^{-5}	s^{-1}
	$k_{di,PtdBE_p}$	$1 \cdot 10^{-1}$	$5,5 \cdot 10^{-5}$	s^{-1}
	$k_{di,UBE}$	$1 \cdot 10^{-1}$	$5,5 \cdot 10^{-5}$	s^{-1}
Constante cinética de escisión	$k_{es,pL}$	$9 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-3}$	s^{-1}
Constantes cinéticas de formación de vesícula	$k_{fc,Al}$	$2,8 \cdot 10^{-16}$	$5 \cdot 10^4$	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{fc,Atf}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{11}$	$M^{-2} s^{-1}$
Sigue a continuación				

Tabla B.4: Valores utilizados en la simulación del modelo propuesto (continuación)

Tipo	Parámetro	Literatura	Simulación	Unidad
Constantes cinéticas de fosforilación	k_{fos,BE_p}	1	$1 \cdot 10^2$	s^{-1}
	k_{fos,e_p}	1	$1 \cdot 10^4$	s^{-1}
	$k_{fos,P}$	1	$1 \cdot 10^4$	s^{-1}
	$k_{fos,Ptd_{3p}}$	1	$1 \cdot 10^4$	$M^{-1} s^{-1}$
Constante cinética de producción	$k_{p,PP}$	$7 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-3}$	s^{-1}
Constantes cinéticas de sustitución de un componente	$k_{su,A12A10}$	$8 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^4$	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{su,A12A5}$	$8 \cdot 10^{-1}$	$1 \cdot 10^4$	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{su,LIA3}$	$8 \cdot 10^{-1}$	$8 \cdot 10^3$	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{su,LIA7}$	$8 \cdot 10^{-1}$	$8 \cdot 10^3$	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{su,LIPE}$	$8 \cdot 10^{-1}$	$8 \cdot 10^3$	$M^{-1} s^{-1}$
	$k_{su,LIPE}$	$8 \cdot 10^{-1}$	$8 \cdot 10^3$	$M^{-1} s^{-1}$
Constantes cinéticas del proceso de traducción	$k_{td,A12}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-8}$	s^{-1}
	$k_{td,AF4}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-8}$	s^{-1}
	$k_{td,BH}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-6}$	s^{-1}
	$k_{td,C}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-8}$	s^{-1}
	$k_{td,MP}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-3}$	s^{-1}
	$k_{td,pL}$	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-6}$	s^{-1}
Constante cinética de transporte de lípidos	$k_{tp,L}$	$8 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^5$	s^{-1}

Es necesario notar que muchos parámetros presentan grandes variaciones a los encontrados en bibliografía. Esto se puede deber a variados factores, uno de los más relevantes es que las constantes cinéticas dependen de la reacción que se está describiendo, en el modelo se presentan algunos componentes que no están presentes en las reacciones que se describen en literatura, por lo que los valores deben ser diferentes. Para tener parámetros que describan el modelo es necesario acotar la aplicabilidad y ajustar parámetros con datos experimentales.

Anexo C

Red de interacciones

A continuación se presenta la red de interacciones que se propone en el modelo. Esta ilustración muestra de forma simplificada los componentes involucrados en cada interacción. Se omiten reversibilidad de reacciones y algunos elementos de salida, con el objetivo de servir como guía para comprender las secciones descritas en el cuerpo del documento.

Anexo D

Código

Se utilizan dos tipos de archivos. El primero tiene todas las ecuaciones y parámetros del modelo, el segundo, denominado main, ejecuta la resolución de las ecuaciones. Para obtener los gráficos es necesario abrir el archivo main en la misma carpeta que el archivo de las ecuaciones y ejecutarlo. A continuación, se presentan los códigos de la simulación del sistema global. Para más detalles de las demás simulaciones ir a los archivos adjuntos correspondientes.

D.1. Código de ecuaciones

```
1 % Simulación de los cambios de concentraciones de proteínas mal plegadas
2 % Input: t      Tiempo
3 %          x    Vector de concentraciones
4 % Output dx   concentraciones en el tiempo
5
6 function dx= Global (t,x)
7 dx = zeros(41,1);
8
9 %% Valores iniciales para cinética de Michaelis-Menten
10 %% Valores de concentraciones totales
11 B_tot=6E-7;
12 P_p_tot=6E-7;
13 BE_p_tot=6E-7;
14 U_tot=6E-7;
15 A4_tot=6E-7;
16 A9_tot=6E-7;
17
18 %% Parámetros
19 %% Constantes de velocidad
20 k_p_PP=7E-3;
21 k_as_BMP=1E4;
22 k_di_BMP=1E-5;
23
24 k_as_BP=1E4;
25 k_di_BP=1E-5;
26 k_fos_P=1E4;
27 k_des_P=1.5E-5;
```

```
28 k_as_eP_p=1E3;
29 k_di_eP_p=5.5E-5;
30 k_fos_e_p=1E4;
31
32 k_di_UBE=5.5E-5;
33 k_as_UBE=1E3;
34 k_fos_BE_p=1E2;
35 k_di_BEBcl=1.5E-5;
36 k_as_BEBcl=1;
37 k_di_PtdBE_p=5.5E-5;
38 k_as_PtdBE_p=1E3;
39 k_fos_Ptd_3p=1E4;
40 k_di_BHBcl=1.5E-5;
41 k_as_BHBcl=1;
42 k_as_A12A7=1E4;
43 k_su_A12A10=1E4;
44 k_su_A12A5=1E4;
45 k_as_A12A5A16=2E4;
46 k_di_A12A5A16=5.2E-3;
47
48 k_es_pL=9E-3;
49 k_di_pLA4=1E-5;
50 k_as_pLA4=2E4;
51 k_as_LIA7=8E3;
52 k_su_LIA3=8E3;
53 k_su_LIA7=8E3;
54 k_su_LIPE=8E3;
55 k_su_LIPE=8E3;
56 k_di_LIA3A12A5A16=1E-5;
57 k_as_LIA3A12A5A16=1E4;
58
59 k_di_LA9=5.5E-5;
60 k_as_LA9=1E4;
61 k_tp_L=1E5;
62 k_fc_Atf=1E11;
63 k_fc_A1=5E4;
64 k_d_A1=4.5E-3;
65
66 k_as_LC3=8E3;
67
68 k_td_A12=5E-8;
69 k_td_C=5E-8;
70
71 k_td_pL=1E-6;
72 k_td_BH=1E-6;
73
74 k_td_MP=1E-3;
75
76 k_d_a12=6.6E-15;
77 k_d_bh=6.6E-15;
78 k_d_c=6.6E-15;
79 k_d_pl=6.6E-15;
80
81 b_a12=2.2E-7;
82 b_bh=2.2E-7;
83 b_c=2.2E-7;
```

```

84 b_pl=2.2E-7;
85
86 b_AF4=2.2E-6;
87 k_d_AF4=2.2E-4;
88 %% k_m [mM] con Michaelis-Menten
89 K_B=(k_di_BMP+k_p_PP)/(k_as_BMP);
90 K_P_p=(k_di_eP_p+k_fos_e_p)/(k_as_eP_p);
91 K_U=(k_di_UBE+k_fos_BE_p)/(k_as_UBE);
92 K_BE_p=(k_di_PtdBE_p+k_fos_Ptd_3p)/(k_as_PtdBE_p);
93 K_A4=(k_es_pL+k_di_pLA4)/(k_as_pLA4);
94 K_A9=(k_tp_L+k_di_LA9)/(k_as_LA9);
95
96 %% Concentraciones calculadas por M-M
97 BMP=(B_tot*x(2))/(K_B+x(2));
98 eP_p=(P_p_tot*x(7))/(K_P_p+x(7));
99 UBE=(U_tot*x(11))/(K_U+x(11));
100 PtdBE_p=(BE_p_tot*x(15))/(K_BE_p+x(15));
101 pLA4=(A4_tot*x(26))/(K_A4+x(26));
102 LA9=(A9_tot*x(35))/(K_A9+x(35));
103
104 %% Sistema de ecuaciones
105 %P x(1)
106 dx(1)=(k_p_PP)*BMP;
107 %M x(2)
108 dx(2)=-(k_as_BMP)*x(3)*x(2)+(k_di_BMP)*BMP-(k_as_LC3)*x(33)*x(2)+(k_td_MP)*x
(7);
109 %B x(3)
110 dx(3)=(k_di_BMP)*BMP-(k_as_BMP)*x(3)*x(2)+(k_p_PP)*BMP+(k_di_BP)*x(5)-(
k_as_BP)*x(3)*x(4);
111 %P x(4)
112 dx(4)=(k_di_BP)*x(5)-(k_as_BP)*x(3)*x(4)+(k_des_P)*x(6)^2-(k_fos_P)*x(4)^2;
113 %BP x(5)
114 dx(5)=-(k_di_BP)*x(5)+(k_as_BP)*x(3)*x(4);
115 %P_p x(6)
116 dx(6)=-(k_des_P)*x(6)^2+(k_fos_P)*x(4)^2-(k_as_eP_p)*x(6)*x(7)+(k_di_eP_p)*
eP_p+(k_fos_e_p)*eP_p;
117 %e x(7)
118 dx(7)=-(k_as_eP_p)*x(6)*x(7)+(k_di_eP_p)*eP_p;
119 %e_p x(8)
120 dx(8)=(k_fos_e_p)*eP_p;
121 %U x(9)
122 dx(9)=(k_di_UBE)*UBE-(k_as_UBE)*x(9)*x(10)+(k_fos_BE_p)*UBE;
123 %BE x(10)
124 dx(10)=(k_di_UBE)*UBE-(k_as_UBE)*x(9)*x(10)+(k_fos_BE_p)*UBE+(k_di_BEBcl)*x
(13)-(k_as_BEBcl)*x(11)*x(12);
125 %BE_p x(11)
126 dx(11)=(k_fos_BE_p)*UBE+(k_di_PtdBE_p)*PtdBE_p-(k_as_PtdBE_p)*x(11)*x(15)+(
k_fos_Ptd_3p)*PtdBE_p;
127 %Bcl x(12)
128 dx(12)=(k_di_BEBcl)*x(13)-(k_as_BEBcl)*x(11)*x(12)+(k_di_BHBcl)*x(14)-(
k_as_BHBcl)*x(47)*x(12);
129 %BEBcl x(13)
130 dx(13)=-(k_di_BEBcl)*x(13)+(k_as_BEBcl)*x(11)*x(12);
131 %BHBcl x(14)
132 dx(14)=-(k_di_BHBcl)*x(14)+(k_as_BHBcl)*x(47)*x(12);
133 %Ptd x(15)

```

```

134 dx(15)= (k_di_PtdBE_p)*PtdBE_p-(k_as_PtdBE_p)*x(11)*x(15);
135 %Ptd_3p x(16)
136 dx(16)=(k_fos_Ptd_3p)*PtdBE_p-(k_fc_Atf)*(x(37))*(x(16))*(x(38));
137 %A12 x(17)
138 dx(17)=-(k_as_A12A7)*x(17)*x(18)+(k_td_A12)*x(43);
139 %A7 x(18)
140 dx(18)=-(k_as_A12A7)*x(17)*x(18)+(k_su_A12A10)*x(19)*x(20)-(k_as_LIA7)*x(28)*x
(18)+(k_su_LIA7)*x(29)*x(30);
141 %A12A7 x(19)
142 dx(19)=(k_as_A12A7)*x(17)*x(18)-(k_su_A12A10)*x(19)*x(20);
143 %A10 x(20)
144 dx(20)=-(k_su_A12A10)*x(19)*x(20)+(k_su_A12A5)*x(21)*x(22);
145 %A12A10 x(21)
146 dx(21)=(k_su_A12A10)*x(19)*x(20)-(k_su_A12A5)*x(21)*x(22);
147 %A5 x(22)
148 dx(22)=-(k_su_A12A5)*x(21)*x(22);
149 %A12A5 x(23)
150 dx(23)=(k_su_A12A5)*x(21)*x(22)-(k_as_A12A5A16)*x(23)*x(24)+(k_di_A12A5A16)*x
(25);
151 %A16 x(24)
152 dx(24)=-(k_as_A12A5A16)*x(23)*x(24)+(k_di_A12A5A16)*x(25);
153 %A12A5A16 x(25)
154 dx(25)=(k_as_A12A5A16)*x(23)*x(24)-(k_di_A12A5A16)*x(25)-(k_as_LIA3A12A5A16)*x
(31)*x(25)+(k_di_LIA3A12A5A16)*x(32)+(k_su_LIPE)*x(32)*x(34);
155 %pL x(26)
156 dx(26)=(k_di_pLA4)*pLA4-(k_as_pLA4)*x(26)*x(27)+(k_td_pL)*x(48);
157 %A4 x(27)
158 dx(27)= (k_di_pLA4)*pLA4-(k_as_pLA4)*x(26)*x(27)+(k_es_pL)*pLA4;
159 %LI x(28)
160 dx(28)=(k_es_pL)*pLA4-(k_as_LIA7)*x(28)*x(18);
161 %LIA7 x(29)
162 dx(29)=(k_as_LIA7)*x(28)*x(18)-(k_su_LIA3)*x(29)*x(30);
163 %A3 x(30)
164 dx(30)=-(k_su_LIA3)*x(29)*x(30)+(k_su_LIPE)*x(32)*x(34);
165 %LIA3 x(31)
166 dx(31)=(k_su_LIA3)*x(29)*x(30)-(k_as_LIA3A12A5A16)*x(31)*x(25)+(
k_di_LIA3A12A5A16)*x(32);
167 %LIA3A12A5A16 x(32)
168 dx(32)=-(k_su_LIA3)*x(29)*x(30)+(k_as_LIA3A12A5A16)*x(31)*x(25)-(
k_di_LIA3A12A5A16)*x(32);
169 %LIPE x(33)
170 dx(33)=(k_su_LIPE)*x(32)*x(34)-(k_as_LC3)*x(33)*x(2);
171 %PE x(34)
172 dx(34)=-(k_su_LIPE)*x(32)*x(34);
173 %L x(35)
174 dx(35)=(k_di_LA9)*x(35)*x(36)-(k_as_LA9)*LA9;
175 %A9 x(36)
176 dx(36)=(k_di_LA9)*x(35)*x(36)-(k_as_LA9)*LA9+(k_tp_L)*LA9;
177 %LC3* x(37)
178 dx(37)=-(k_fc_Atf)*(x(37))*(x(16))*(x(38))+(k_as_LC3)*x(33)*x(2);
179 %L* x(38)
180 dx(38)=(k_tp_L)*LA9-(k_fc_Atf)*(x(37))*(x(16))*(x(38));
181 %Atf x(39)
182 dx(39)=(k_fc_Atf)*(x(37))*(x(16))*(x(38))-(k_fc_A1)*x(39)*x(40);
183 %Lis x(40)
184 dx(40)=-(k_fc_A1)*x(39)*x(40);

```

```

185 %A1 x(41)
186 dx(41)=(k_fc_A1)*x(39)*x(40)-(k_d_A1)*x(41);
187 %AF4 x(42)
188 dx(42)= (b_AF4)*(x(8))/(k_d_AF4+(x(8)));
189 %a12 x(43)
190 dx(43)= (b_a12)*(x(42))/(k_d_a12+(x(42)));
191 %c x(44)
192 dx(44)=(b_c)*(x(42))/(k_d_c+x(42));
193 %C x(45)
194 dx(45)=(k_td_C)*x(44);
195 %bh x(46)
196 dx(46)= (b_bh)*(x(45))/(k_d_bh+(x(45)));
197 %BH x(47)
198 dx(47)= (k_td_BH)*x(46);
199 %pl x(48)
200 dx(48)= (b_pl)*(x(42))/(k_d_pl+(x(42)));
201 return

```

Listing D.1: Código de ecuaciones del modelo global de degradación de proteínas.

D.2. Código Main

```

1 % Resolución del sistema
2 clc
3 clear all
4
5 % Condiciones de sistema
6 % Definir el intervalo de tiempo
7 ti=0; %tiempo inicial
8 tf=2000; %tiempo final
9
10 x0=[0 1E-6 1E-7 1E-7 0 0 1E-7 0 1E-7 1E-7 0 1E-7 0 0 1E-7 0
      1E-7 1E-7 0 1E-7 0 1E-7 0 1E-7 0 0 1E-7 0 0
      1E-7 0 1E-7 0 1E-7 1E-7 1E-7 1E-7 1E-7 0 1E-7 0 0
      0 0 0 0 0 0]; %vector concentraciones iniciales de []
11 % [PP,MP, B, P, BP,P_p,e, e_p,U, BE, BE_p,Bcl, BEBcl,BHBcl,Ptd,
      Ptd_3p,A12, A7, A12A7,A10, A12A10,A5, A12A5,A16, A12A5A16,pL, A4, LI,
      LIA7,A3, LIA3,LIA3A12A5A16,LIPE,PE, L, A9, LC3*,L*, Atf, Lis, Al,
      AF4, a12,c, C, bh,BH,pl]
12 %%RESOLUCION CON ODE45
13 [T,X]=ode45('Global',[ti tf],x0);
14
15 %%GRAFICO 1
16 figure (1)
17 grid on
18 hold on;
19 plot(T,X(:,16),'—', T,X(:,25),'—', T,X(:,26),'—',T,X(:,33),'—',T,X(:,39),'k',T,
      X(:,41),'*'); %graficos de las distintas concentraciones
20 legend(' [Ptd_{3p}] ',' [A12A5A16] ',' [pL] ',' [LIPE] ',' [Atf] ',' [Al] ');
21 title('Concentraciones en el tiempo'); xlabel('Tiempo [s]'); ylabel('
      Concentración [M]');
22 %%GRAFICO 2
23 figure (2)
24 grid on
25 hold on;

```

```
26 plot(T,X(:,1), T,X(:,2), T,X(:,3)); %graficos de las distintas concentraciones
27 legend(' [PP] ', ' [MP] ', ' [B] ');
28 title('Concentraciones en el tiempo'); xlabel('Tiempo [s]'); ylabel('
    Concentración [M]');
```

Listing D.2: Código principal para ejecución de ecuaciones del modelo de degradación de proteínas.