

## Biologia dei Sistemi A.A. 2015/16

# Modelli di reti biologiche di regolazione

***Prof. Carlo Cosentino***

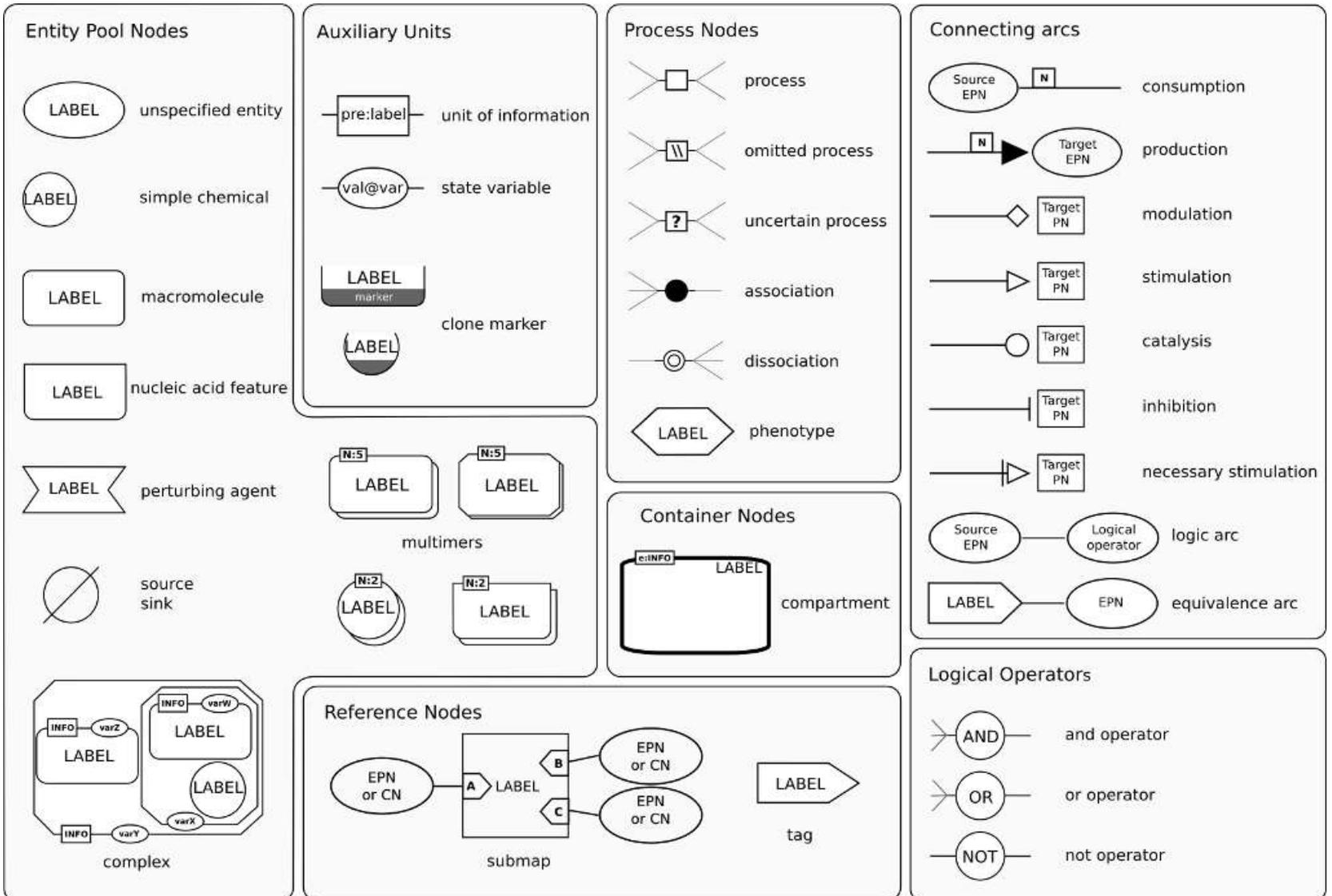
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica  
Università degli Studi Magna Graecia di Catanzaro  
tel: 0961-3694051

[carlo.cosentino@unicz.it](mailto:carlo.cosentino@unicz.it)

<http://bioingegneria.unicz.it/~cosentino>

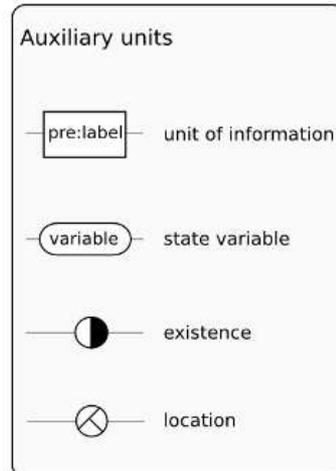
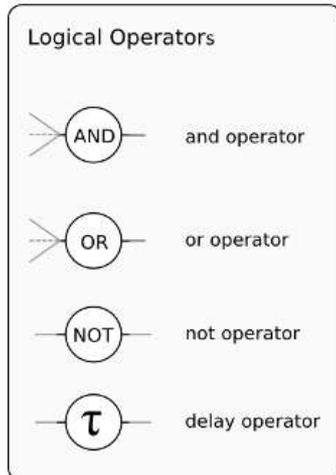
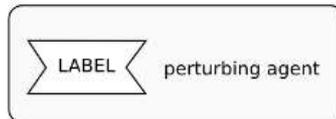
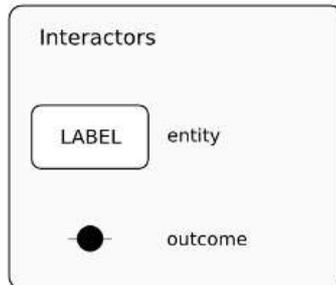
<http://wpage.unina.it/carcosen>

- ✦ Principalmente usato per la descrizione grafica di sistemi biochimici
- ✦ Adotta lo standard SBGN ⇒ notazione standardizzata, non ambigua, che può essere esportata in altri software per analisi e simulazione
- ✦ Systems Biology Graphical Notation include tre tipologie di diagrammi
  - ✦ Process Descriptions (SBGN-PD)
  - ✦ Entity Relationships (SBGN-ER)
  - ✦ Activity Flows (AF)
- ✦ E' possibile includere metadati, incluso link a database su proteine, reazioni, etc.

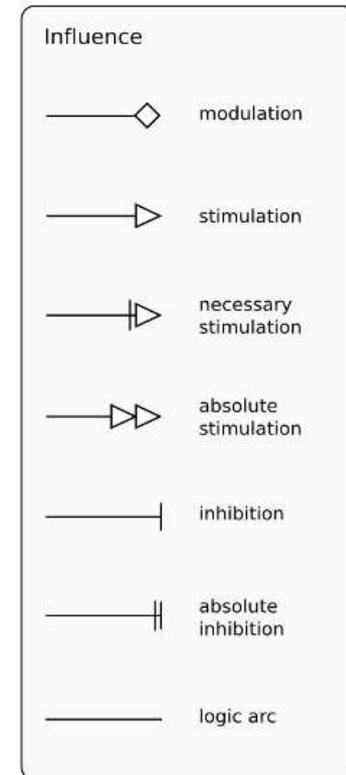
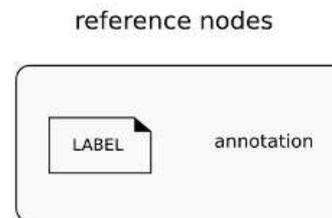
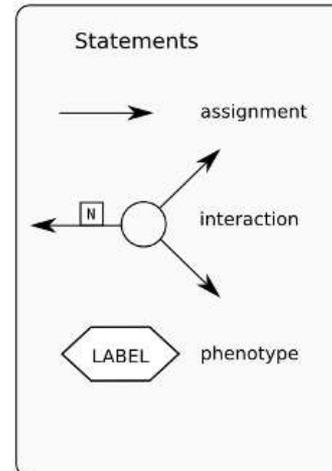


## SYSTEMS BIOLOGY GRAPHICAL NOTATION ENTITY RELATIONSHIP REFERENCE CARD

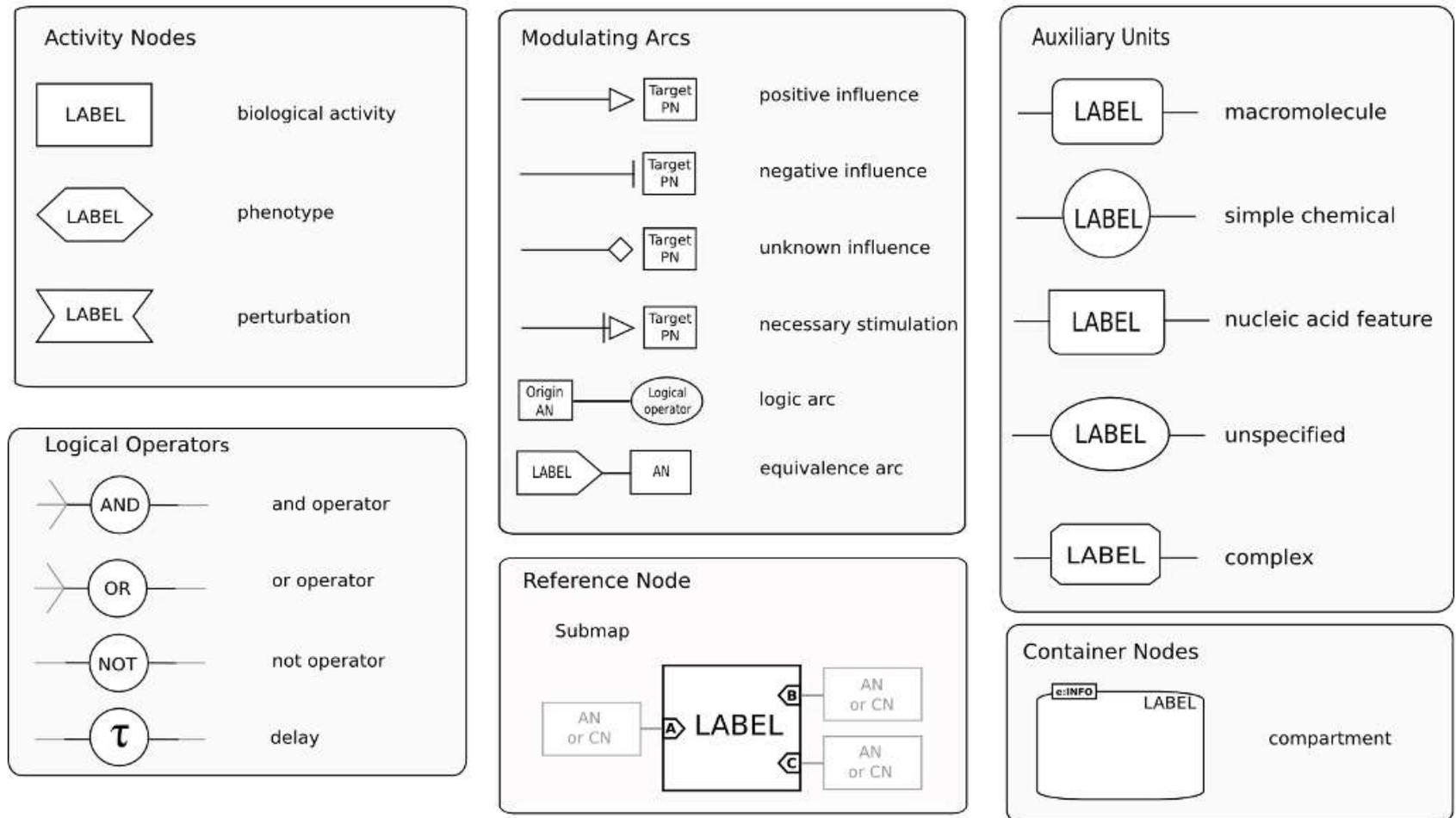
### Entity Nodes

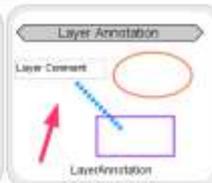
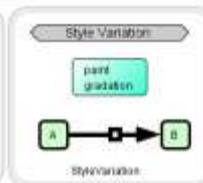
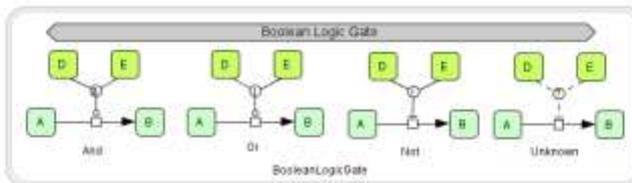
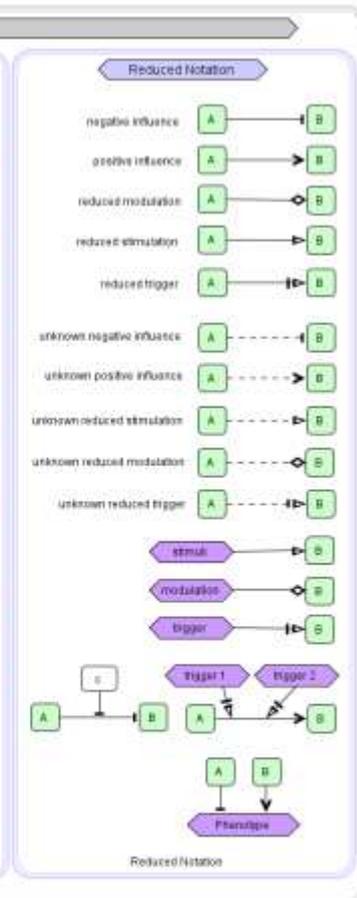
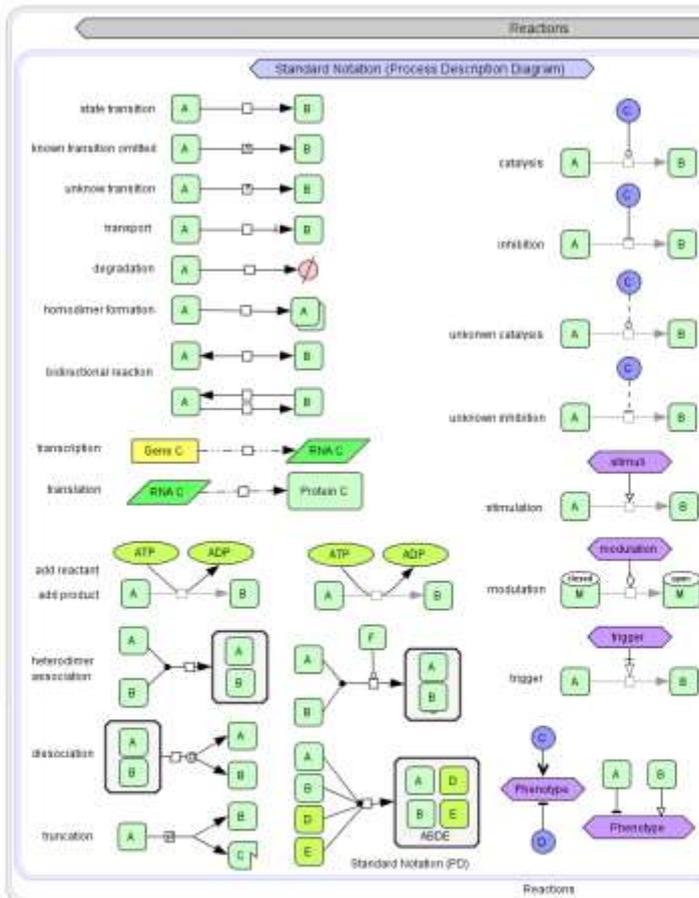
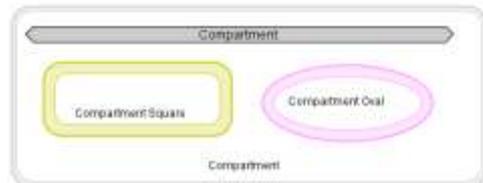
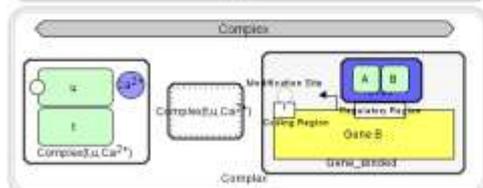
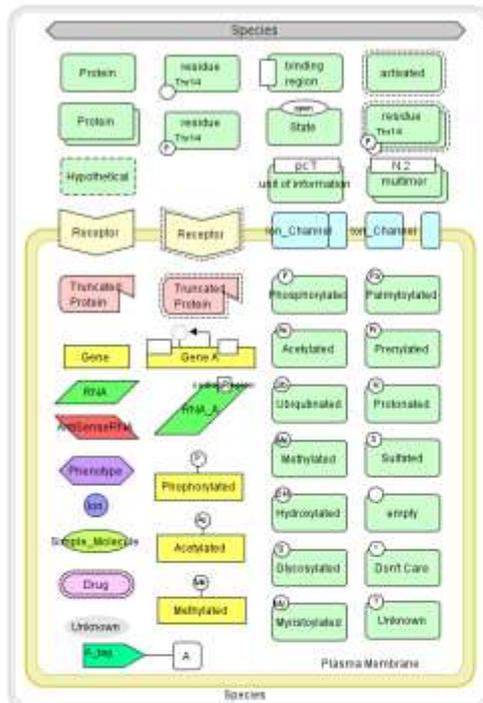


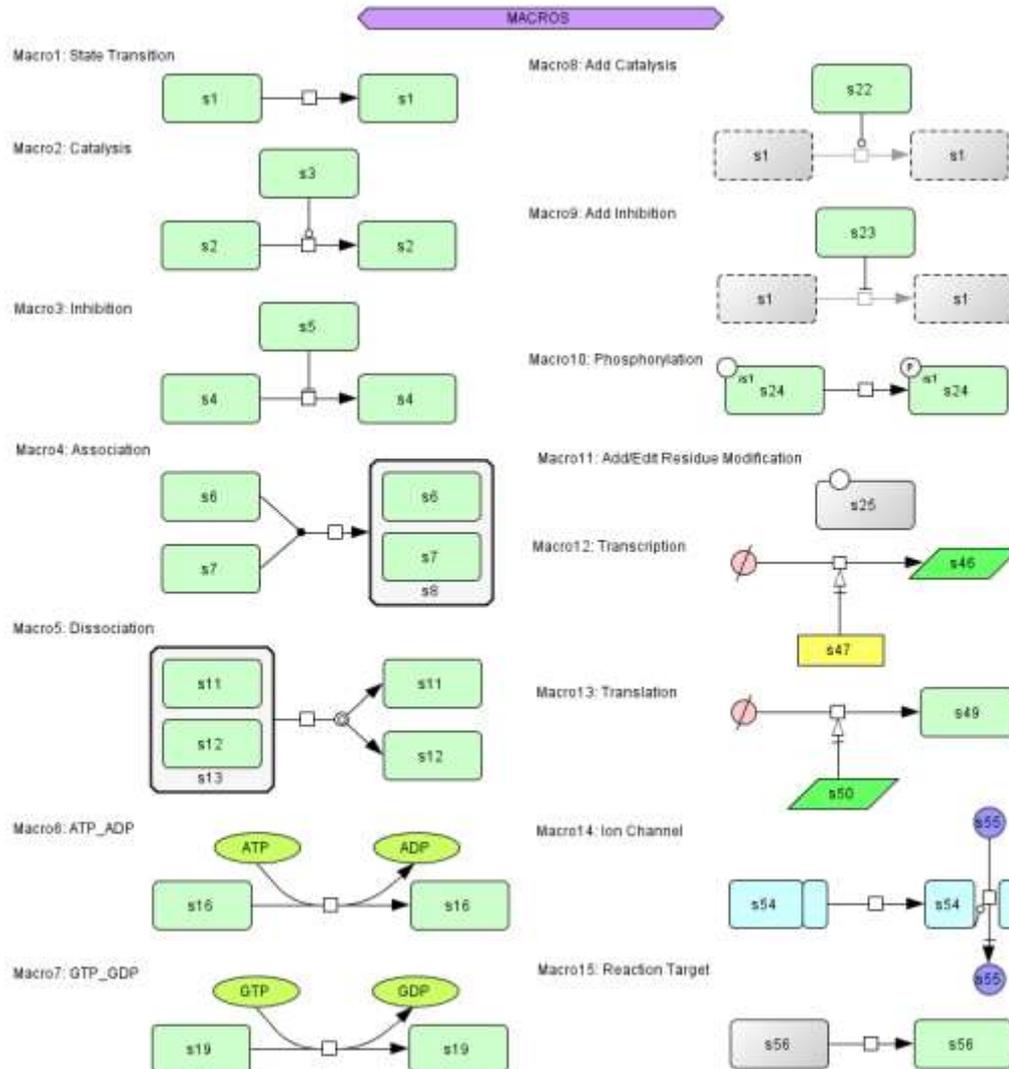
### Relationship Nodes



## SYSTEMS BIOLOGY GRAPHICAL NOTATION ACTIVITY FLOW DIAGRAM REFERENCE CARD



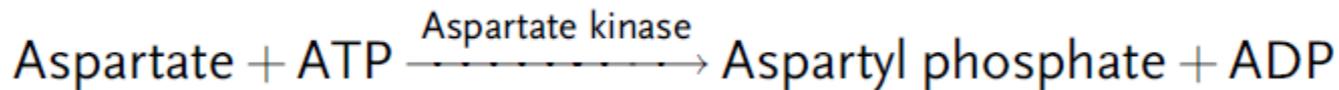




- ✧ CellDesigner è molto ricco dal punto di vista grafico, ma carente nella parte di costruzione del modello matematico, di simulazione e di strumenti per l'analisi del modello
- ✧ Per questi compiti, conviene utilizzare altri software, come il COPASI (free), che permette di
  - ✧ Costruire modelli secondo lo standard SBML
  - ✧ Effettuare simulazioni sia deterministiche che stocastiche
  - ✧ Effettuare molti tipi di analisi del modello, quali
    - ★ Analisi della matrice stechiometrica
    - ★ Calcolo dei punti di equilibrio e relative proprietà di stabilità
    - ★ Simulazioni al variare dei parametri
    - ★ Identificazione dei parametri a partire da dati sperimentali
    - ★ ...



- ✦ Il Systems Biology Markup Language (SBML) è il più diffuso formato di rappresentazione dei modelli biologici
- ✦ La sua creazione è stata necessaria per favorire lo scambio di modelli tra utilizzatori di software diversi (attualmente circa 280)
- ✦ La sintassi è analoga a quella di una pagina XML, basata su dei tag che marcano i vari tipi di informazione in una struttura gerarchica



```

(1) <?xml version="1.0" encoding="UTF-8" ?>
(2) <sbml level="2" version="1" xmlns="http://www.
sbml.org/sbml/level2">
(3) <model id="AK_reaction">
(4) <listOfUnitDefinitions>
(5) <unitDefinition id="mmol">
(6) <listOfUnits>
(7) <unit kind="mole" scale="-3" />
(8) </listOfUnits>
(9) </unitDefinition>
(10) <unitDefinition id="mmol_per_litre_per_sec">
(11) <listOfUnits>
(12) <unit kind="mole" scale="-3" />
(13) <unit kind="litre" exponent="-1" />
(14) <unit kind="second" exponent="-1" />
(15) </listOfUnits>
(16) </unitDefinition>
(17) </listOfUnitDefinitions>
(18) <listOfCompartments>
(19) <compartment id="cell" name="Cell" size="1"
units="volume" />
(20) </listOfCompartments>

```

```

(21) <listOfSpecies>
(22) <species id="asp" name="Aspartate"
compartment="cell" initialConcentration="2"
substanceUnits="mmol" />
(23) <species id="aspp" name="Aspartyl phosphate"
compartment="cell" initialConcentration="0"
substanceUnits="mmol" />
(24) <species id="atp" name="ATP" compartment="cell"
initialConcentration="0" substanceUnits="mmol" />
(25) <species id="adp" name="ADP" compartment="cell"
initialConcentration="0" substanceUnits="mmol" />
(26) </listOfSpecies>
(27) <listOfReactions>
(28) <reaction id="AK" reversible="false">
(29) <listOfReactants>
(30) <speciesReference species="asp"
stoichiometry="1" />
(31) <speciesReference species="atp"
stoichiometry="1" />
(32) </listOfReactants>
(33) <listOfProducts>
(34) <speciesReference species="aspp"
stoichiometry="1" />

```

• • •

- ✦ BioPAX, per la descrizione di sistemi di reazioni biologiche
- ✦ MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment)
- ✦ MIAPE (Minimum Information About a Proteomics Experiment)
- ✦ MIRIAM (Minimum Information Requested in the Annotation of biochemical Models)



- ▲ Lo sviluppo di modelli biologici richiede diversi tipi di dati
  - ✦ Componenti (metaboliti, proteine, geni,...)
  - ✦ Funzioni dei singoli componenti
  - ✦ Interazioni tra i componenti
  
- ▲ Oltre alla letteratura scientifica, questi dati sono ormai disponibili in forma più accessibile e organizzata in numerosi database, ad es.
  - ✦ KEGG: geni, proteine, enzimi, pathways
  - ✦ Reactome: processi biologici, pathways
  - ✦ BRENDA, SABIO-RK: dati cinetici
  - ✦ BioModels: 610 modelli curati + 866 modelli non curati

# Caso-studio 1: analisi di reti di segnalazione coinvolte nella tumorigenesi



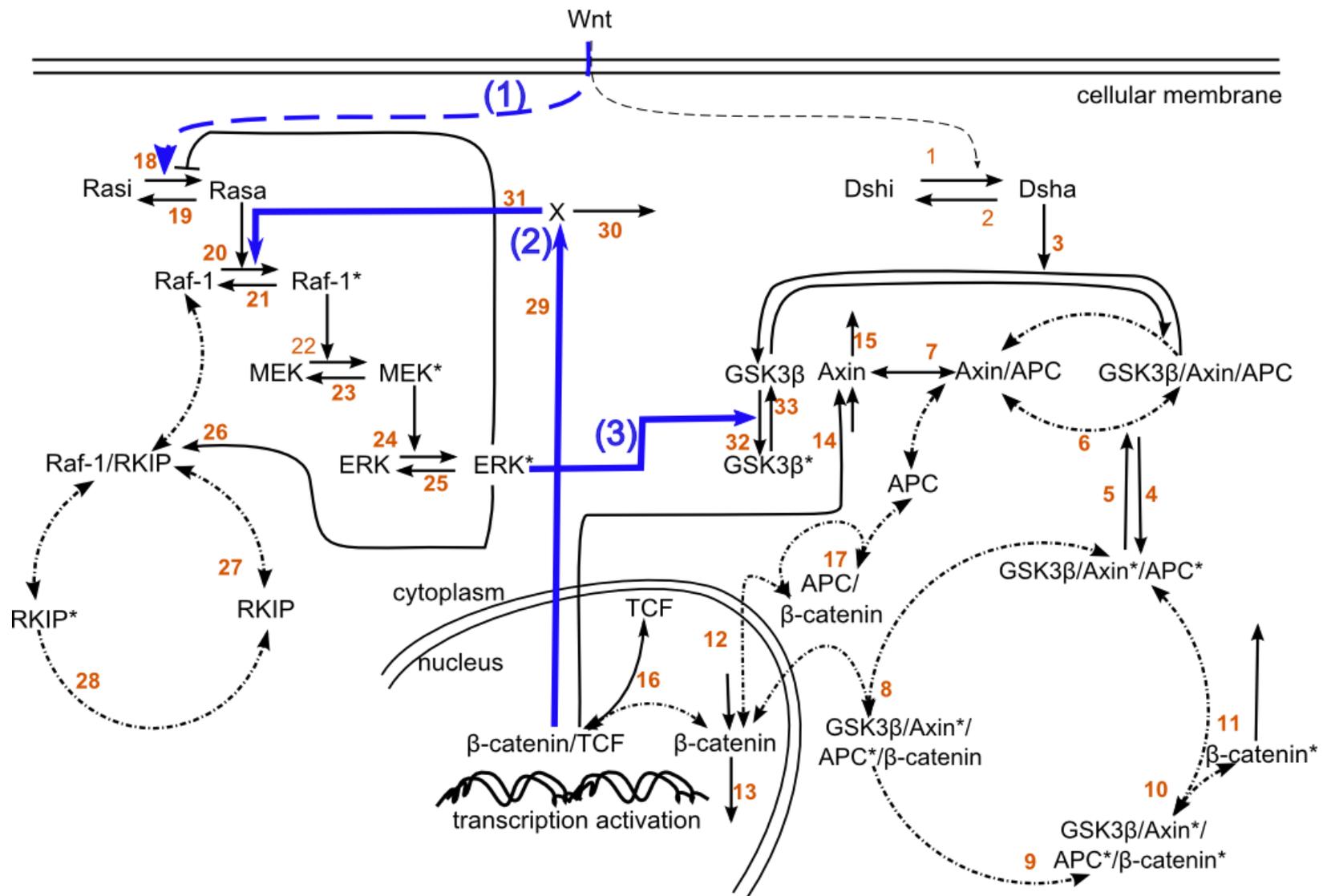
- ✦ I pathway di Wnt e ERK sono entrambi coinvolti nella patogenesi di vari tipi di cancro, in particolare quelli del colon-retto
- ✦ In seguito alla scoperta di meccanismi di crosstalk tra questi due pathway, Kim et al hanno sviluppato un modello matematico per studiare gli effetti sistemici di questi meccanismi

[Kim D., Rath O., Kolch W., Cho K.-H., A hidden oncogenic positive feedback loop caused by crosstalk between Wnt and ERK Pathways. Oncogene \(2007\) 26, 4571-4579](#)

- ✦ Il modello è stato creato integrando ed estendendo modelli preesistenti dei due pathway



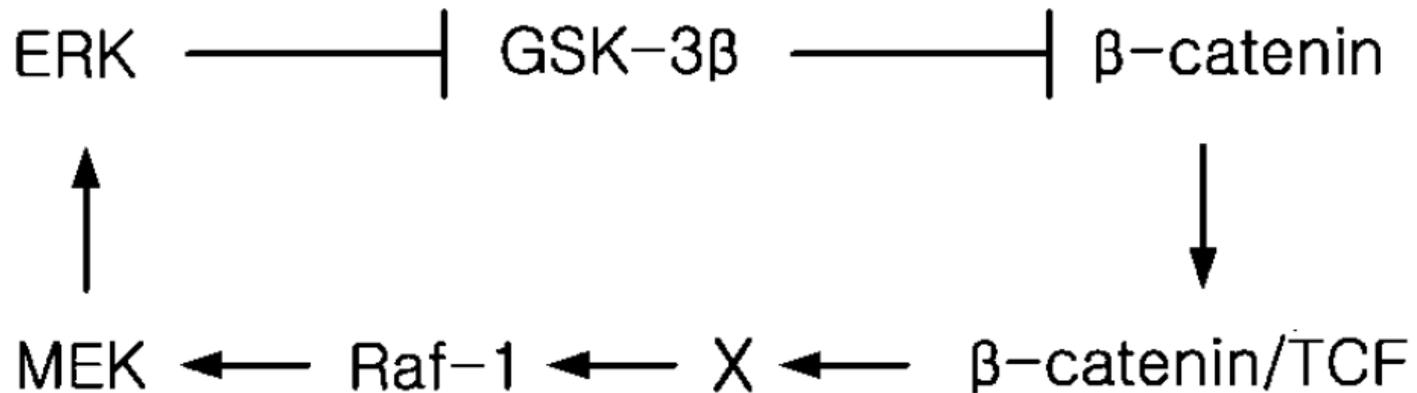
# Wnt-ERK crosstalk





- ✦ La costruzione e l'analisi del modello hanno permesso di identificare un ciclo di feedback positivo realizzato proprio attraverso il crosstalk
- ✦ L'analisi mostra che questo feedback positivo può generare un comportamento bistabile in entrambi i pathway, come confermato dagli esperimenti
- ✦ Tramite il modello sono state identificate due mutazioni, che portano a condizioni tumorigeniche, ossia ad una anomala attivazione persistente dei due pathway in assenza di stimoli extracellulari:
  - ✦ Produzione aumentata di  $\beta$ -catenina
  - ✦ Riduzione della velocità delle fosfatasi nella cascata delle MAP chinasi.

- ⤴ L'attivazione di ERK induce l'inibizione di GSK-3 $\beta$  e quindi fa diminuire la degradazione di  $\beta$ -catenina, che si accumula nel nucleo

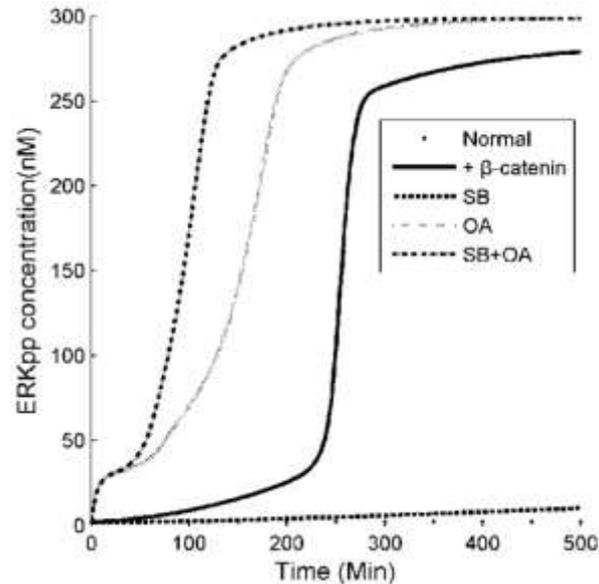
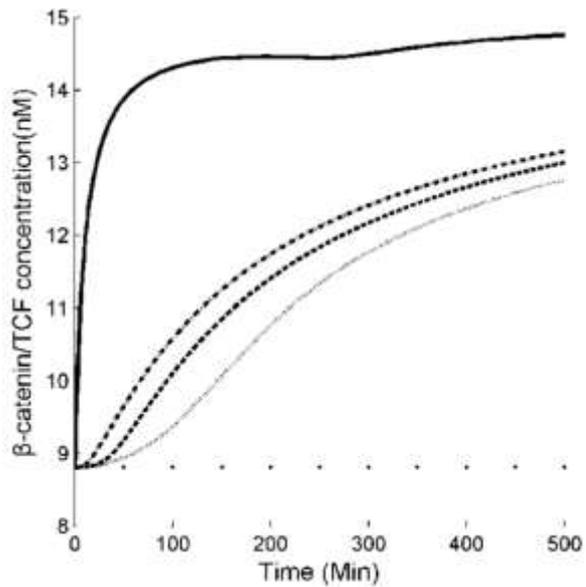




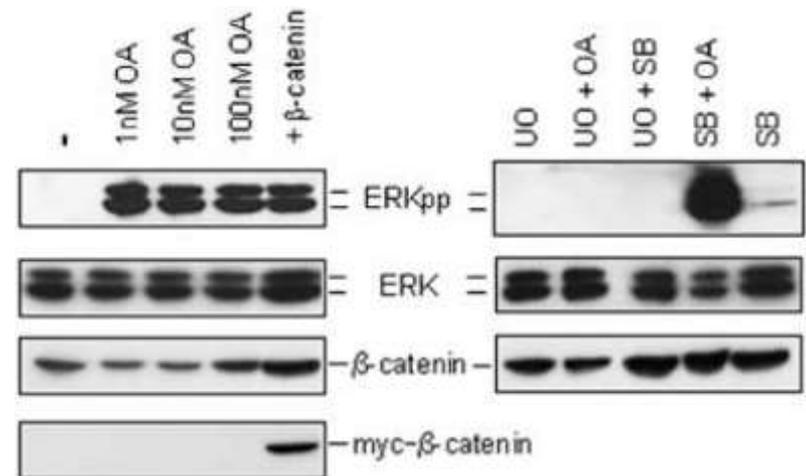
- ✦ Segnali di attivazione dei due pathway: concentrazioni di  $\beta$ -catenina e di ERKpp
- ✦ L'attivazione costitutiva dei due pathway è ottenuta mediante
  - a) Incremento della sintesi di  $\beta$ -catenina
    - ⇒ attivazione del pathway di Wnt
  - b) Uso di OA (Okadaic acid), inibitore delle fosfatasi di ERK
    - ⇒ attivazione del pathway di ERK
  - c) Uso di SB (SB216763), inibitore di GSK-3 $\beta$ 
    - ⇒ attivazione del pathway di Wnt
  - d) Uso combinato di OA + SB
    - ⇒ attivazione di entrambi i pathway Wnt e ERK



- ✦ Vediamo come possiamo simulare queste condizioni in COPASI
  - a) Incremento della sintesi di  $\beta$ -catenina
    - ⇒ parametro  $V_{12}$  moltiplicato per 20
  - b) Uso di OA (Okadaic acid), inibitore delle fosfatasi di ERK
    - ⇒ dimezzare le velocità della MEK fosfatasi ( $V_{\max4}$ ) e della ERK fosfatasi ( $V_{\max5}$ )
  - c) Uso di SB (SB216763), inibitore di GSK-3 $\beta$ 
    - ⇒ dividere per 100 la velocità della GSK-3 $\beta$  fosfatasi ( $V_{\max7}$ )
  - d) Uso combinato di OA + SB
    - ⇒ attivazione di entrambi i pathway Wnt e ERK



- ⤴ Durata stimolazione in esperimenti: 240 min
- ⤴ La stimolazione con OA porta subito a saturazione l'attività di ERKpp
- ⤴ UO, inibitore di MEK, è stato usato per determinare se l'attivazione di ERKpp avveniva a monte di MEK





- ✧ Studiamo ora come può cambiare la risposta del sistema Wnt/ERK a fronte di uno stimolo esterno
- ✧ Normalmente, un pathway di segnalazione si attiva solo in presenza di un segnale esterno (come un fattore di crescita) e si spegne quando lo stimolo cessa
- ✧ Simulazione 1:
  - ✧ forniamo uno stimolo transitorio mediante il segnale di attivazione del pathway di Wnt
  - ✧ verifichiamo che i livelli di  $\beta$ -catenina e ERKpp ritornano ai livelli originali dopo che il segnale esterno si spegne

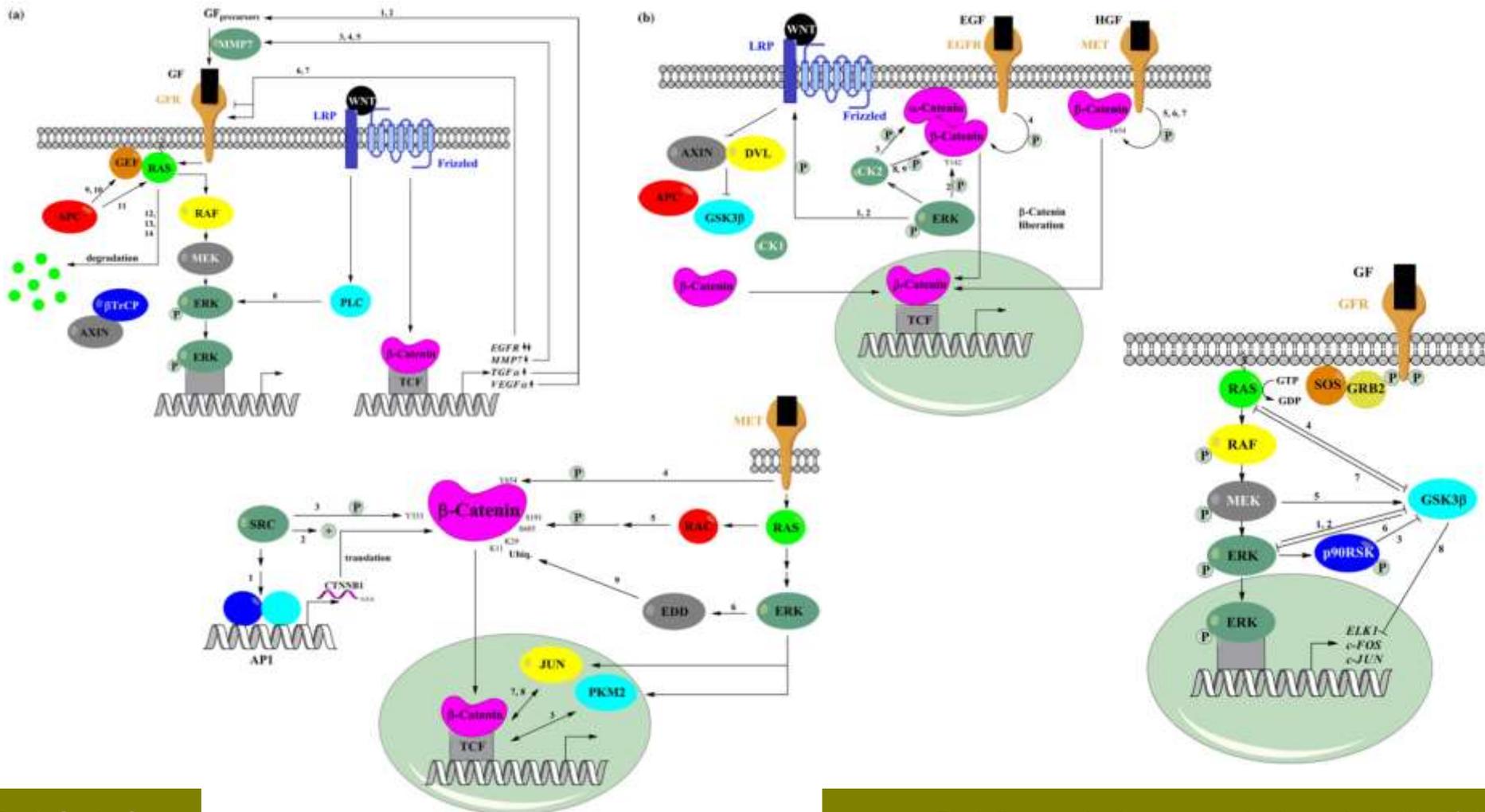


- ✦ Simulazione 2:
  - ✦ Raddoppiare la velocità di sintesi di  $\beta$ -catenina ( $V_{12}$ )
  - ✦ In alternativa, ridurre di 3/4 le velocità di MEK e ERK fosfatasi ( $V_{\max 4}$ ,  $V_{\max 5}$ )
- ✦ Si vede che, pur in presenza moderate modifiche, i due pathway possono rimanere costitutivamente attivati anche in assenza di stimolo esterno



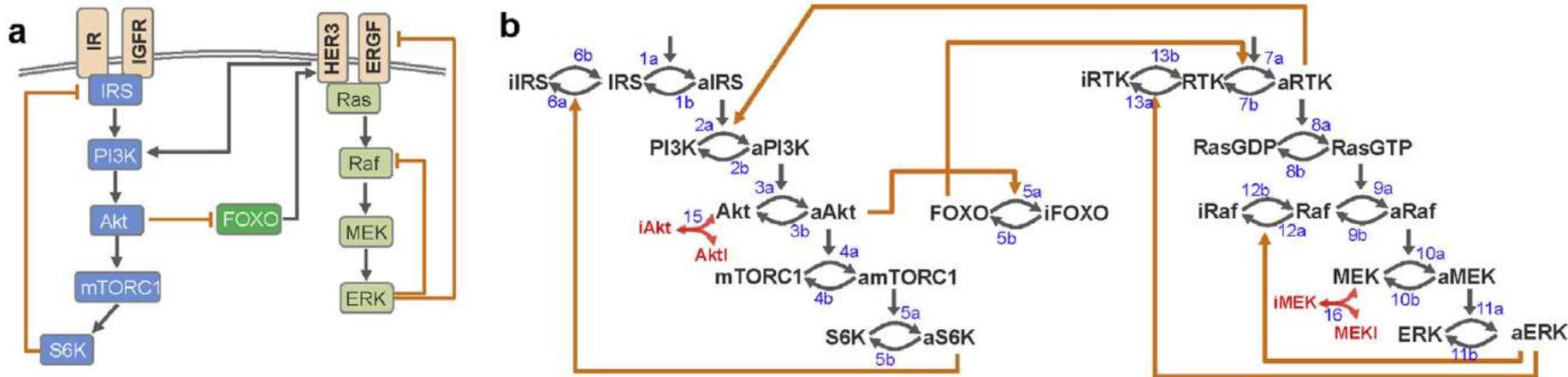
- ✦ [Tan et al. Wnt signalling pathway parameters for mammalian cells. \(2012\) PLoS ONE 7\(2\):e31882.](#)
- ✦ Kim et al usano parametri presi da un modello precedentemente sviluppato sulla base di esperimenti su *Xenopus*.
- ✦ In questo articolo, usando esperimenti al confocale, vengono misurate le concentrazioni di varie specie ( $\beta$ -catenina, Axina, APC, GSK-3 $\beta$ ) in cellule umane di cancro del colon-retto
- ✦ I valori dei parametri e delle concentrazioni possono essere molto differenti da specie a specie!

▲ [Zeller et al. Mechanisms of RAS/ \$\beta\$ -catenin interactions. Archives of Toxicology \(2013\) 87:611-632.](#)



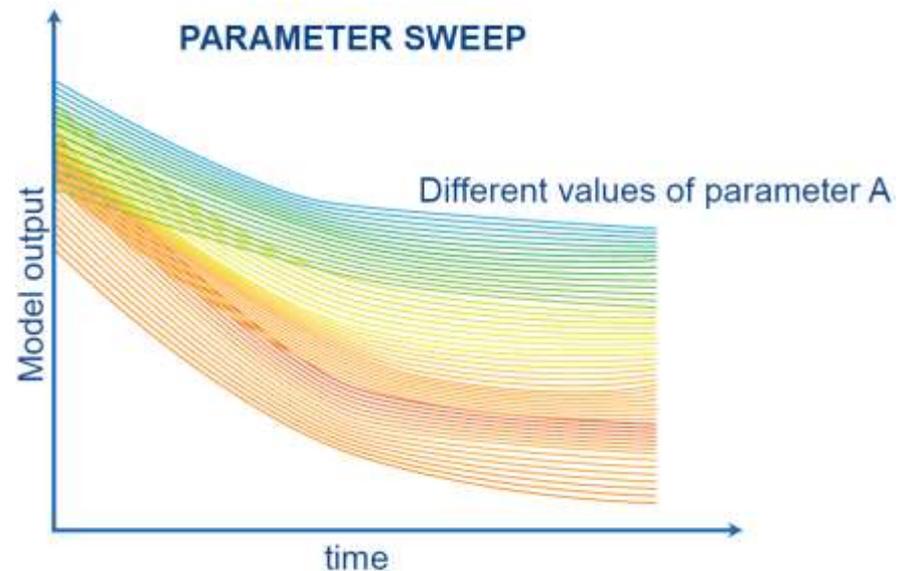
✦ [Nguyen L.K., Kholodenko B.N. Feedback regulation in cell signalling: Lessons for cancer therapeutics. \*Seminars in Cell & Developmental Biology\* \(2016\) 50:85-94.](#)

- ✦ Effetti dei feedback positivi e negativi nei pathway di segnalazione
- ✦ Ruolo dei modelli computazionali per l'analisi e la progettazione di strategie terapeutiche basate su combinazione di farmaci
- ✦ Analisi del crosstalk tra i pathway di Akt/mTOR e RTK/MAPK



# Analisi parametrica dei modelli biologici

- ✦ Variazioni dei parametri possono influenzare in maniera più o meno significativa il comportamento del sistema
- ✦ Un'analisi di tipo visivo può essere fatta visualizzando l'uscita del sistema al variare del parametro (parameter sweep)
- ✦ La **Sensitivity Analysis (SA)** mira a fornire una misura quantitativa dell'effetto di queste variazioni



## Calibrazione del modello

*Quali parametri è più importante tarare con cura?*

## Riduzione del modello

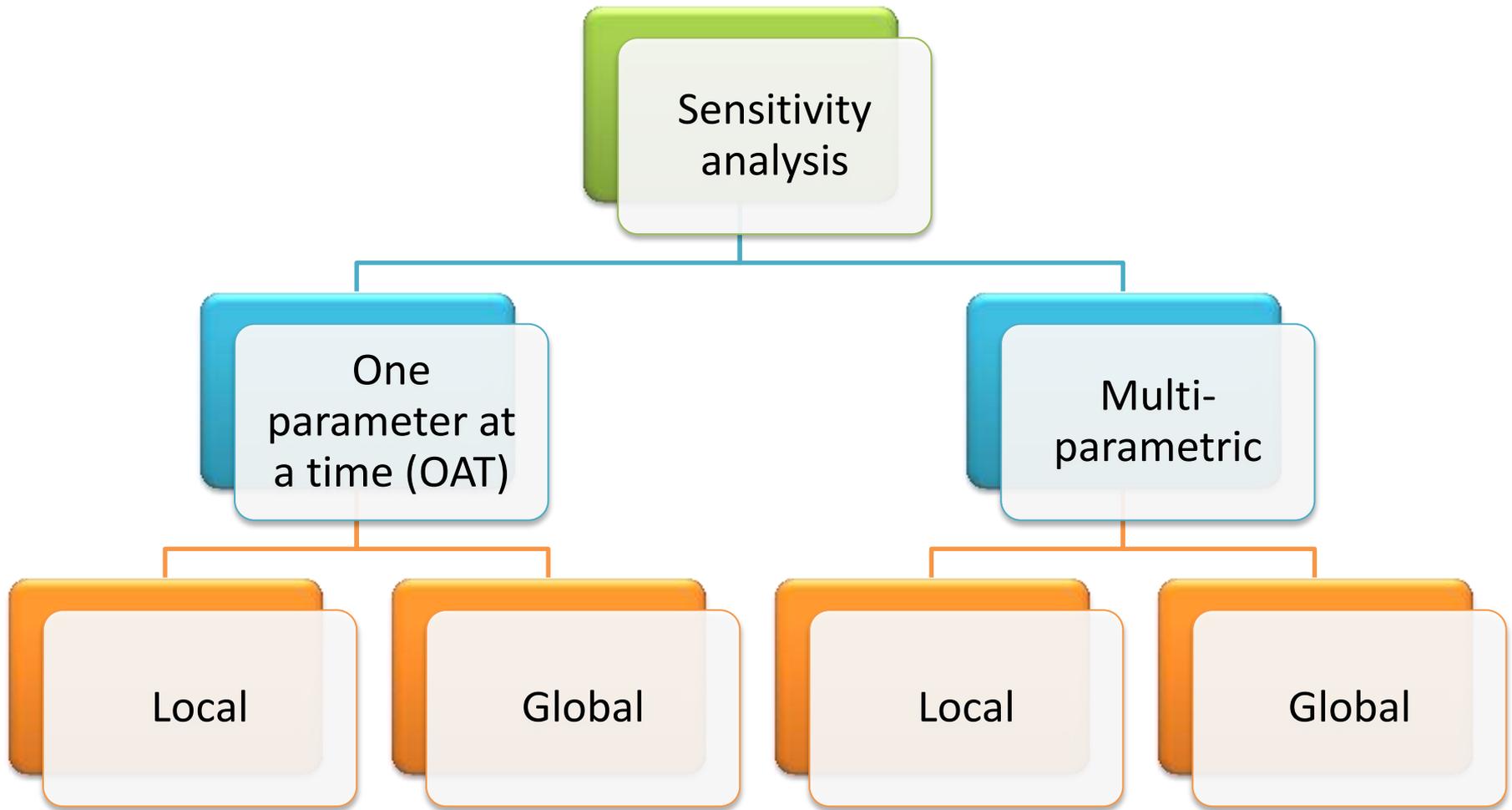
*Quali sono i parametri meno significativi, che possono essere eliminati?*

## Analisi di Robustezza

*Le predizioni del modello sono robuste a fronte della fisiologica variabilità dei parametri?*

## Controllo del sistema

*Quali sono i parametri che hanno maggiore effetto sulla variabile da controllare?*





## ⤴ **Vantaggi**

- ✦ Semplicità
- ✦ Computazionalmente efficace

## ⤴ **Svantaggi**

- ✦ Non esplora tutto lo spazio dei parametri (ma solo lungo gli assi)
- ✦ Non è possibile identificare effetti di interazione tra parametri
- ✦ Il risultato dipende dal punto nominale intorno a cui vado a fare l'analisi

## ✦ Vantaggi

- ✦ Esplora in maniera più approfondita lo spazio dei parametri
- ✦ Mette in evidenza possibili effetti di interazione tra parametri
- ✦ Se globale, non dipende dalla scelta del punto nominale

## ✦ Svantaggi

- ✦ Metodi di esplorazione più sofisticati
- ✦ Costo computazionale elevato se #parametri maggiore di qualche unità (ad es., 10 parametri, 10 valori ciascuno  $\Rightarrow 10^{10}$  simulazioni!)

- Derivata parziale dell'output  $Y$  rispetto al parametro  $X_i$

$$S_{X_i, Y} = \left| \frac{\partial Y}{\partial X_i} \right|_{X^0}$$

dove  $X^0$  è il valore nominale del vettore dei parametri, nell'intorno del quale si calcola la sensitività per piccole variazioni (metodo OAT locale)

- Se vogliamo normalizzare rispetto ai valori di  $Y$  e di  $X$ , possiamo calcolare

$$S_{X_i, Y} = \left| \frac{\partial Y/Y}{\partial X_i/X_i} \right|_{X^0} = \left| \frac{\partial \ln Y}{\partial \ln X_i} \right|_{X^0}$$



- ✦ La scansione parametrica consiste nel simulare il modello per una serie assegnata di valori e può fornire diverse informazioni utili
  - ✦ Come varia il comportamento del sistema al variare dei parametri?
  - ✦ Quali sono i parametri che devono essere tarati con maggiore cura e quelli che possono essere trascurati
  - ✦ Quali proprietà del sistema sono più robuste/fragili a variazioni parametriche?



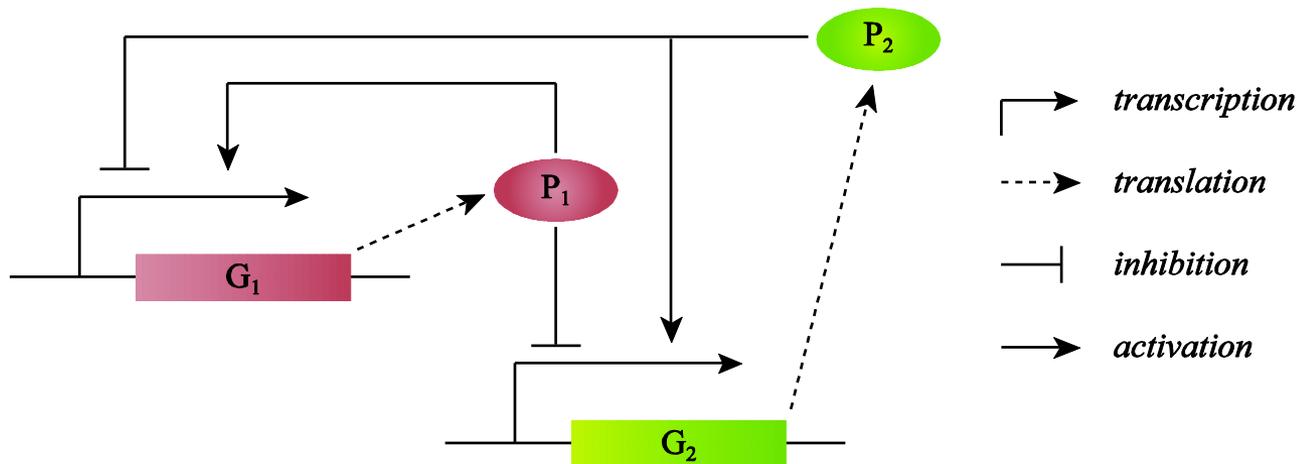
- ✦ Vediamo come si può eseguire un scansione parametrica, utilizzando come caso-studio il modello di crosstalk Wnt-ERK
- ✦ Task 1: analisi della sensitività delle concentrazioni steady-state rispetto a variazioni di tutti i parametri
- ✦ Task 2: analisi della sensitività della concentrazione steady-state di  $\beta$ -Catenina/TCF rispetto a variazioni di tutti i parametri
  - ✦ Si vede che tra i parametri che influenzano maggiormente questo complesso c'è il rate di sintesi ( $V_{12}$ )
- ✦ Task 2: analisi della sensitività della concentrazione steady-state di ERK\* rispetto a variazioni di tutti i parametri
  - ✦ Si vede che ERK\* è influenzato significativamente, oltre alle reazioni della cascata delle MAPK, anche da molte reazioni del pathway di Wnt
- ✦ Task 3: analisi della sensitività di ERK\* e di  $\beta$ -Catenin/TCF alle concentrazioni iniziali
  - ✦ Si vede che sono molto sensibili alle conc. iniz. delle stesse specie



- ✧ Per valutare l'effetto delle concentrazioni iniziali e la presenza di possibili fenomeni di bistabilità, effettuiamo delle scansioni
  - ✧ rispetto alla conc. iniz. di  $\beta$ -Catenina/TCF, GSK-3 $\beta$ , APC, TCF
- ✧ Per velocizzare i calcoli è possibile effettuare un *sampling* del sottospazio dei parametri
  - ✧ La scansione rispetto ad ogni parametro fa esplodere il numero di simulazioni all'aumentare dei parametri
  - ✧ Il sampling, invece, prende  $N_s$  punti casuali nello spazio dei parametri, facendo variare simultaneamente tutti i parametri scelti
- ✧ Dai grafici delle concentrazioni steady-state di ERK\* e  $\beta$ -Catenin/TCF si evince che il sistema presenta più punti di equilibrio stabile

# Sistemi multistabili

- Due geni,  $G_1$  e  $G_2$ , producono due proteine  $P_1$  e  $P_2$ , che promuovono la propria trascrizione e si inibiscono a vicenda



- Come possiamo studiare il comportamento di questo sistema?
- Dobbiamo costruire un modello matematico della rete di regolazione

- Il modello base di regolazione trascrizionale è composto da due variabili per ogni gene: espressione del gene ( $x_i$ ) e conc. della proteina ( $y_i$ )

$$\dot{x}_i = m_i \cdot f_i(\mathbf{y}) - \lambda_i^{\text{RNA}} \cdot x_i$$

$$\dot{y}_i = r_i \cdot x_i - \lambda_i^{\text{Prot}} \cdot y_i \quad i = 1, \dots, n$$

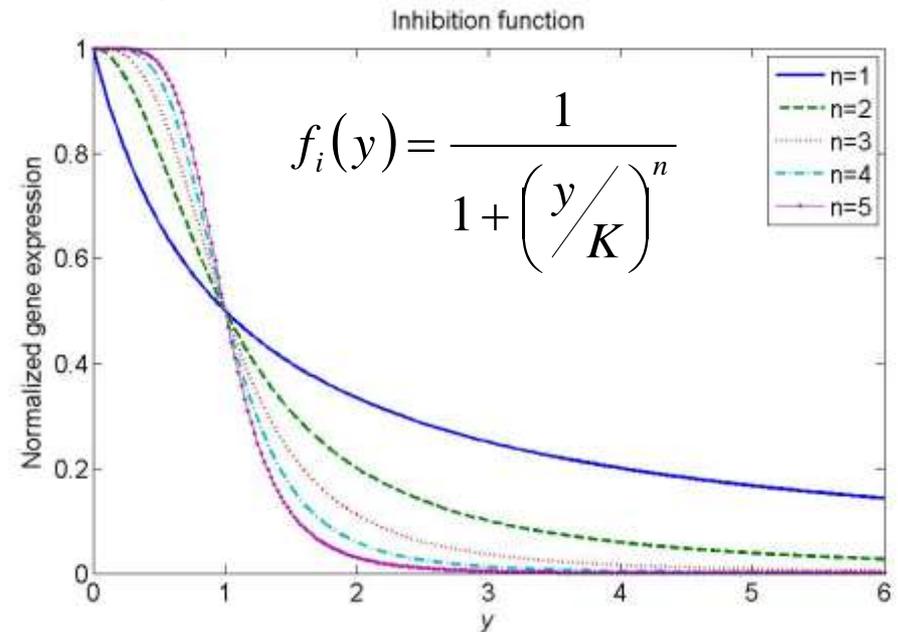
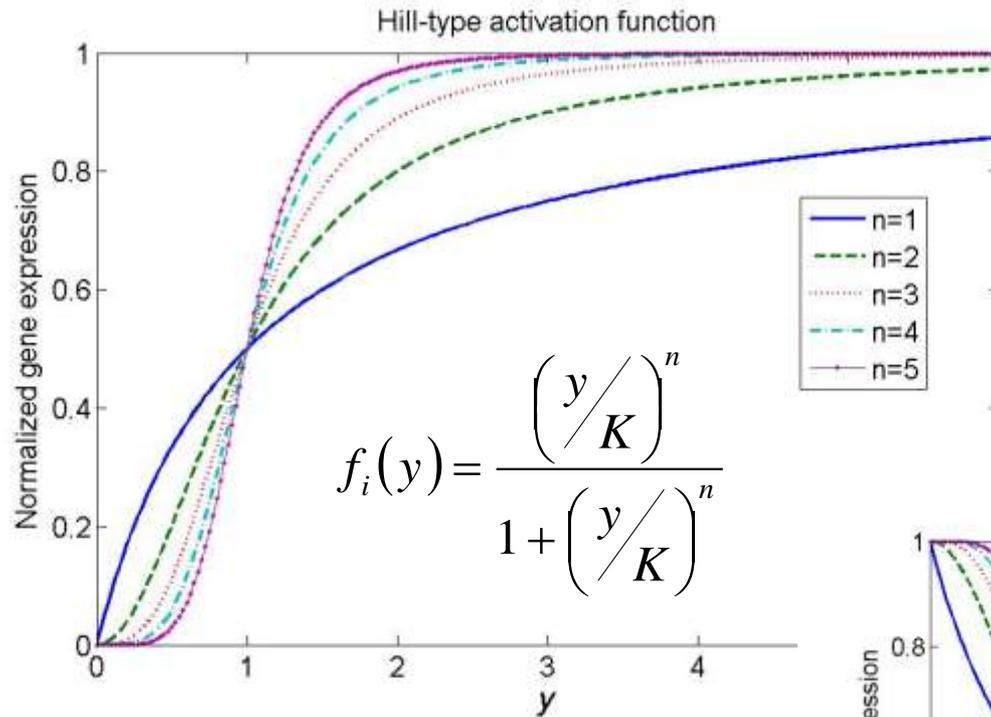
| Parameter                 | Description              |
|---------------------------|--------------------------|
| $m_i$                     | Max transcription rate   |
| $\lambda_i^{\text{RNA}}$  | mRNA degradation rate    |
| $r_i$                     | Translation rate         |
| $\lambda_i^{\text{Prot}}$ | Protein degradation rate |
| $k_{ij}$                  | Dissociation constant    |
| $n_{ij}$                  | Hill coefficient         |

- Ipotesi semplificativa: una sola proteina per ogni gene!
- La funzione di ingresso  $f_i(\mathbf{y})$  calcola l'attivazione relativa del gene  $i$  in funzione delle proteine fattori di trascrizione
- In un tipico esperimento di trascrittomica vengono misurati solo i valori a regime delle variabili  $x_i$

- ✦ La topologia della rete è implicatamente definita dalle funzioni  $f_i(\mathbf{y})$
- ✦ Le proteine che appaiono in  $f_i(\mathbf{y})$  definiscono le relazioni di regolazione per il gene  $i$ -esimo
- ✦ Tipicamente  $f_i(\mathbf{y})$  viene scelta come una funzione razionale

✦ 1 fattore di trascrizione   $f_i(y_j) = \frac{\alpha_0 + \alpha_1 \chi_j}{1 + \chi_j} \quad \chi_j = \left( \frac{y_j}{k_{ij}} \right)^{n_{ij}}$

✦ 2 fattori di trascrizione   $f_i(y_j, y_k) = \frac{\alpha_0 + \alpha_1 \chi_j + \alpha_2 \chi_k + \alpha_3 \rho_3 \chi_j \chi_k}{1 + \chi_j + \chi_k + \rho_3 \chi_j \chi_k}$



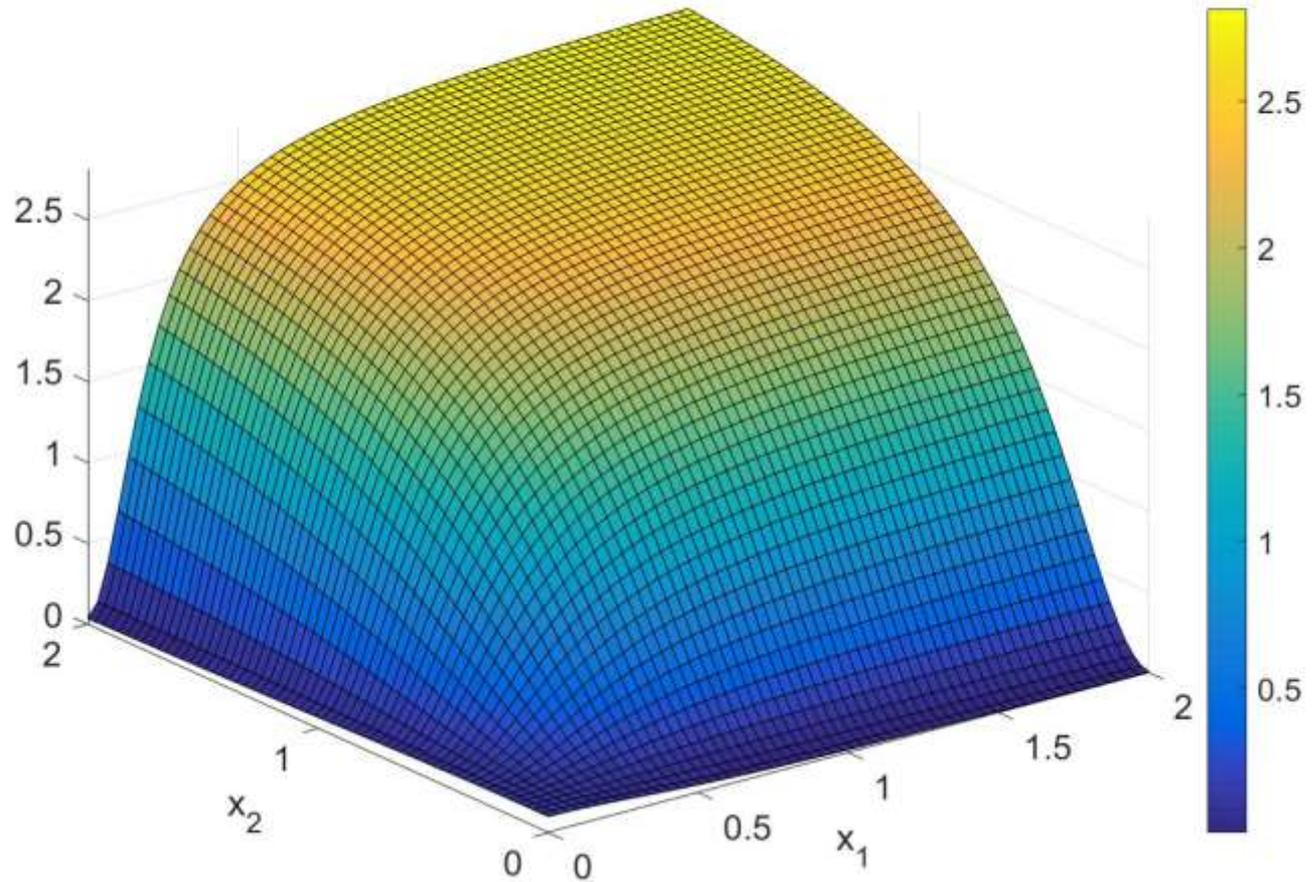
$$a_1 = 0$$

$$a_2 = 0$$



Funzione  
tipo AND

$$f(x_1, x_2) = \frac{a_0 + a_1 \left(\frac{x_1}{k_1}\right)^{n_1} + a_2 \left(\frac{x_2}{k_2}\right)^{n_2} + a_3 r_3 \left(\frac{x_1}{k_1}\right)^{n_1} \left(\frac{x_2}{k_2}\right)^{n_2}}{1 + \left(\frac{x_1}{k_1}\right)^{n_1} + \left(\frac{x_2}{k_2}\right)^{n_2} + r_3 \left(\frac{x_1}{k_1}\right)^{n_1} \left(\frac{x_2}{k_2}\right)^{n_2}}$$



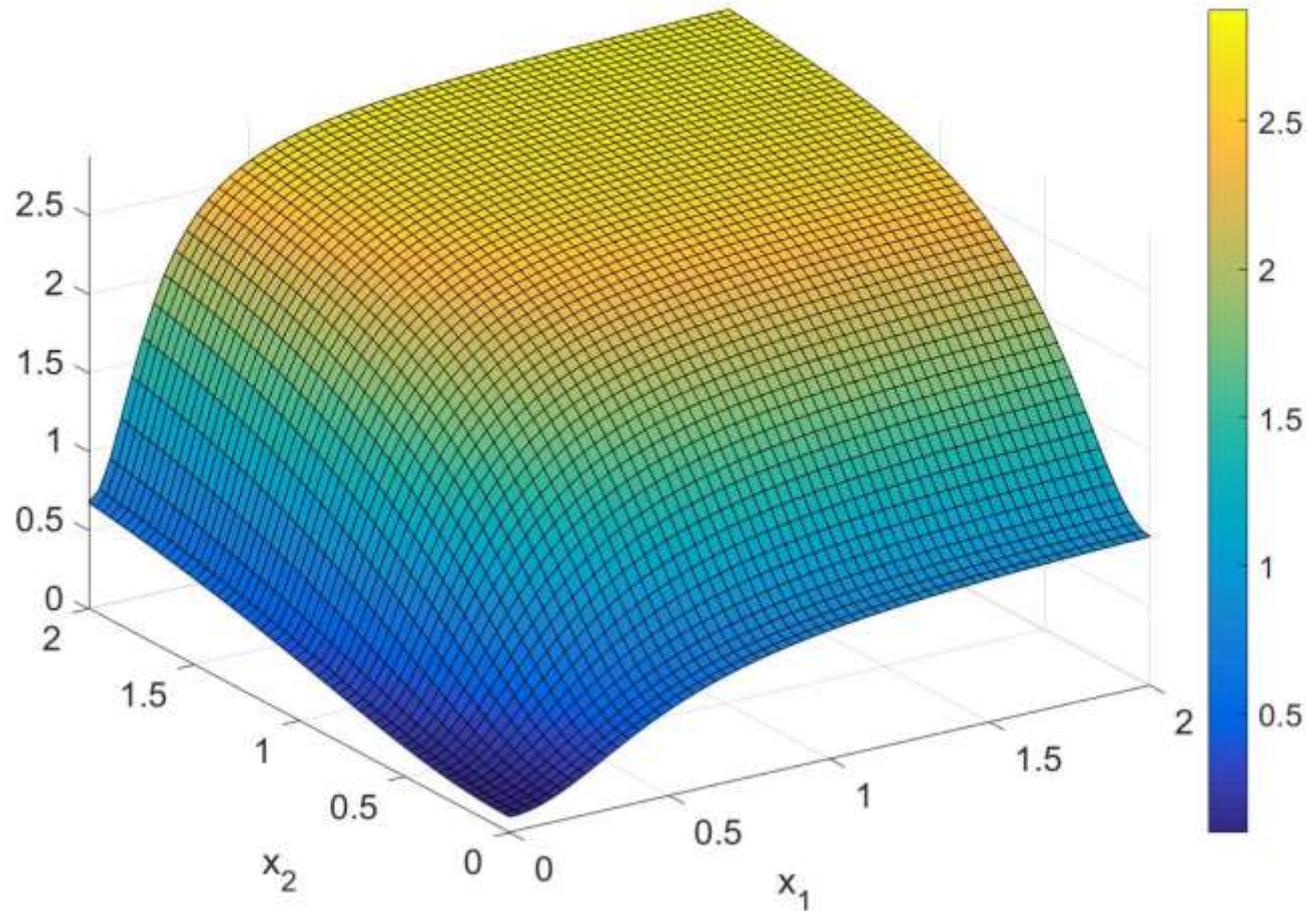
$$a_1 \neq 0$$

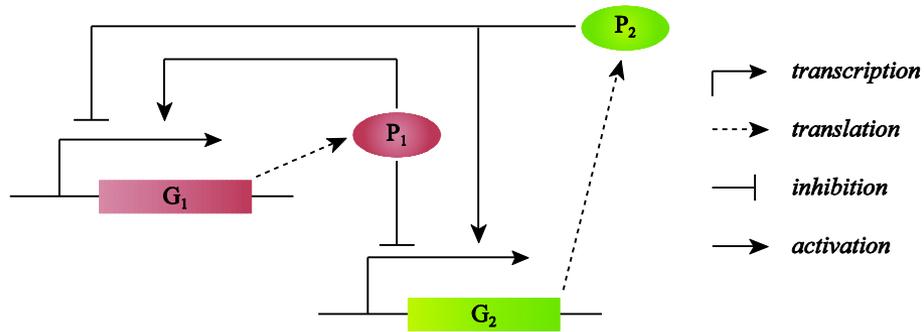
$$a_2 \neq 0$$



Funzione  
tipo OR

$$f(x_1, x_2) = \frac{a_0 + a_1 \left(\frac{x_1}{k_1}\right)^{n_1} + a_2 \left(\frac{x_2}{k_2}\right)^{n_1} + a_3 r_3 \left(\frac{x_1}{k_1}\right)^{n_1} \left(\frac{x_2}{k_2}\right)^{n_2}}{\left(1 + \left(\frac{x_1}{k_1}\right)^{n_1} + \left(\frac{x_2}{k_2}\right)^{n_1} + r_3 \left(\frac{x_1}{k_1}\right)^{n_1} \left(\frac{x_2}{k_2}\right)^{n_2}\right)}$$



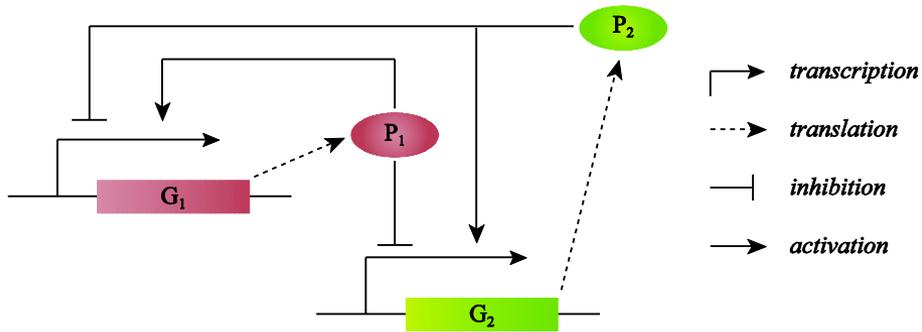


$$\dot{x} = \mu_1 \left( \frac{\alpha_0 + \alpha_1 \left( \frac{x}{K_1} \right)^{h_1}}{1 + \left( \frac{x}{K_1} \right)^{h_1} + \left( \frac{y}{K_2} \right)^{h_2}} \right) - \lambda_{d1} x$$

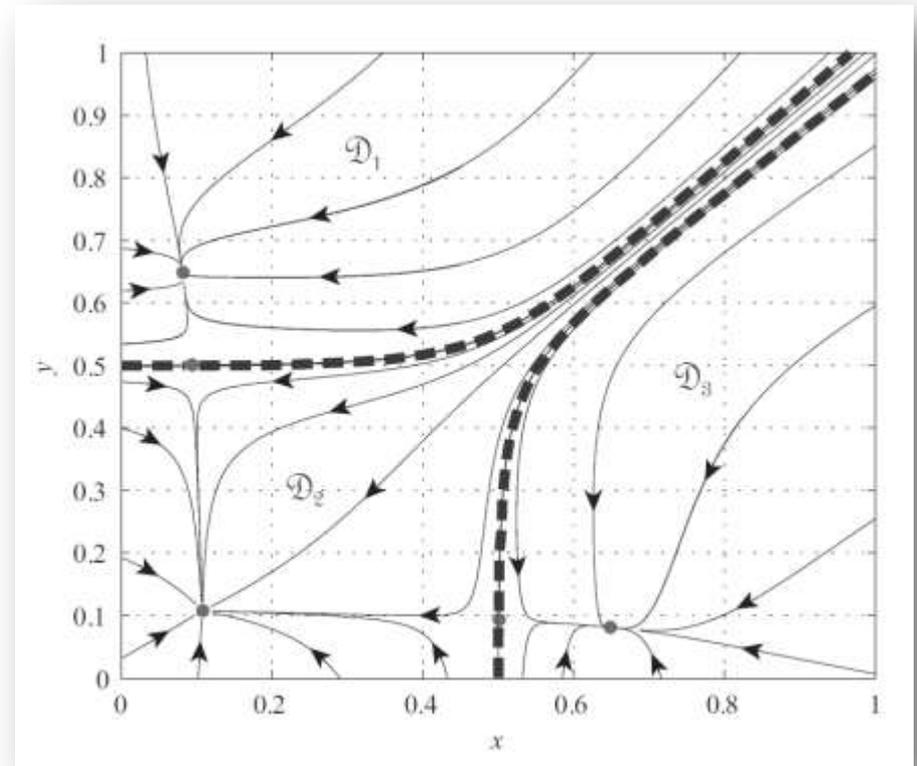
$$\dot{y} = \mu_2 \left( \frac{\beta_0 + \beta_1 \left( \frac{y}{K_3} \right)^{h_3}}{1 + \left( \frac{x}{K_4} \right)^{h_4} + \left( \frac{y}{K_3} \right)^{h_3}} \right) - \lambda_{d2} y.$$

✧  $\alpha_0 \mu_1$  e  $\beta_0 \mu_2 \Rightarrow$  livelli di espressione basale

✧  $\lambda_{d1}$  e  $\lambda_{d2} \Rightarrow$  coefficienti di degradazione (cinetica del primo ordine)



- ⤴ Il sistema ha 3 punti di equilibrio
- ⤴ Nel diagramma possiamo identificare le 3 regioni di attrazione
- ⤴ Quando la traiettoria del sistema oltrepassa il confine tratteggiato, cambia la condizione operativa



# Studio delle biforcazioni

- Si consideri un generico sistema dinamico nonlineare, dipendente da un parametro  $\alpha$

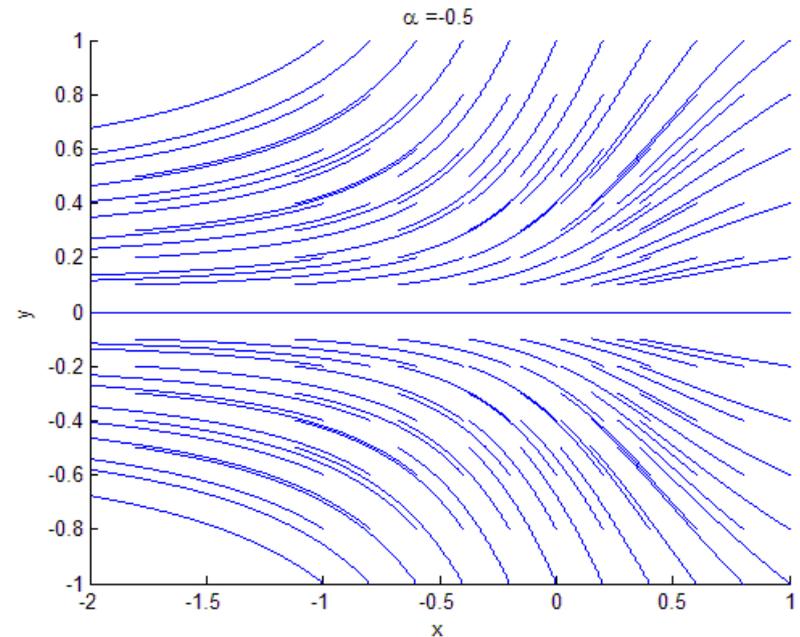
$$\dot{x} = f(x, \alpha), \quad x \in \mathbb{R}^n$$

- Al variare di  $\alpha \in \mathbb{R}$ , l'equazione

$$f(x, \alpha) = 0$$

può ammettere una, nessuna o molteplici soluzioni (ossia p. di equilibrio)  $\bar{x}$

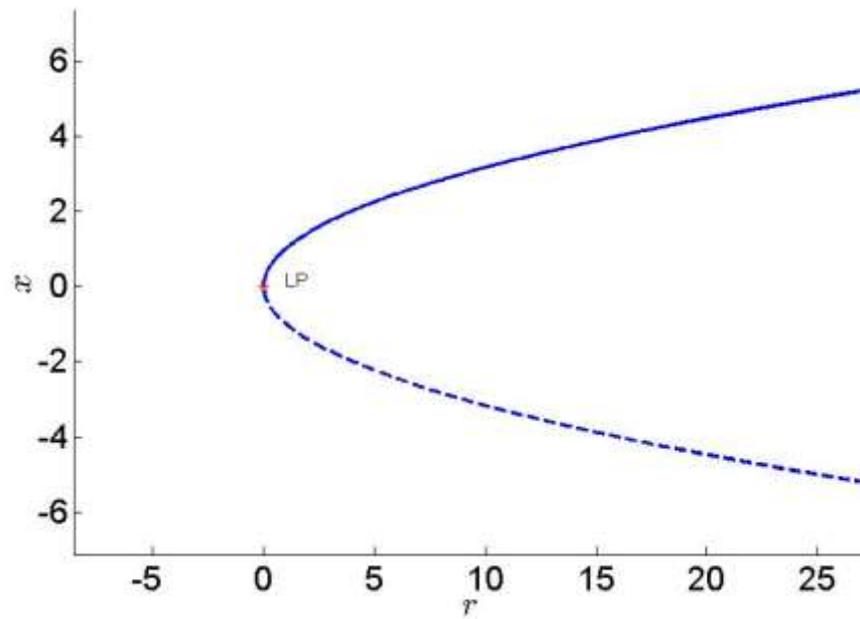
- Si ha una biforcazione (locale) quando una piccola variazione di un parametro modifica il numero ed il tipo dei p. di equilibrio
- Una biforcazione determina una brusca variazione del comportamento del sistema



$$\begin{aligned} \dot{x} &= \alpha - x^2 \\ \dot{y} &= -y \end{aligned}$$

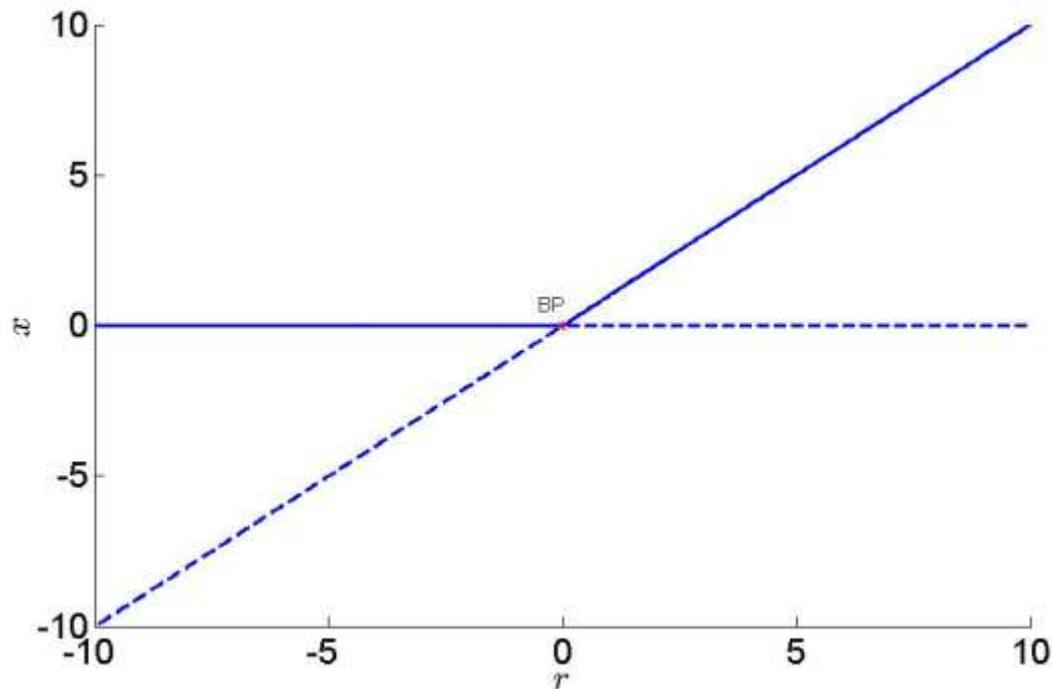
- ⤴ Due punti di equilibrio, uno asint. stabile e l'altro instabile, si avvicinano all'aumentare del parametro, fino a collidere e scomparire
- ⤴ Esempio (da fare in MatCont):

$$\dot{x} = r - x^2$$



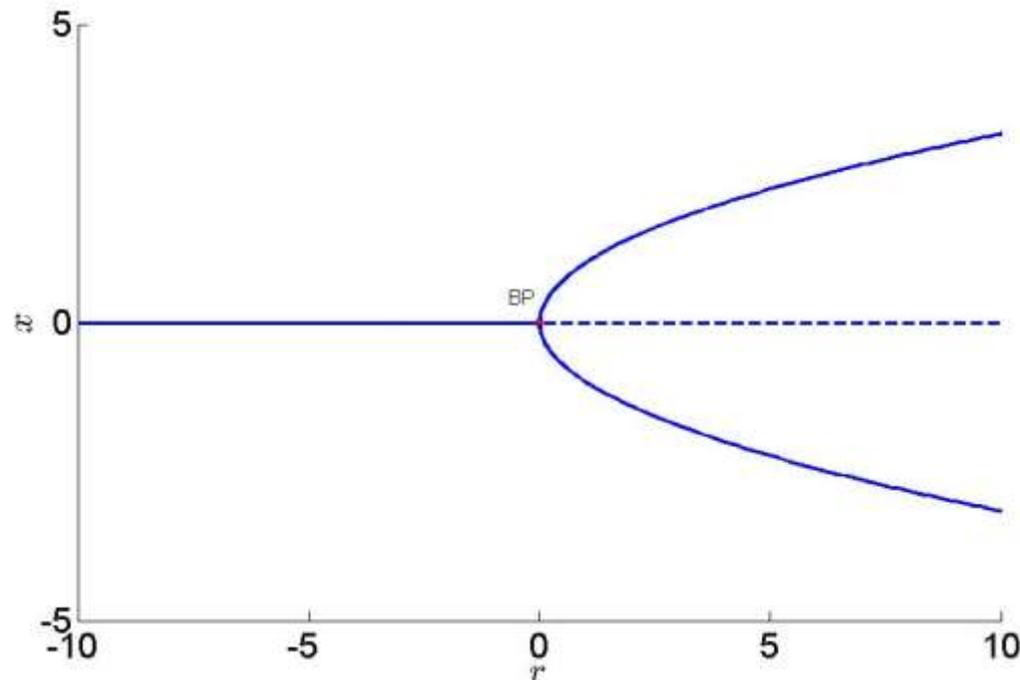
- ⤴ Due p. di eq., uno stabile e l'altro instabile, che si avvicinano fino a collidere, poi si separano scambiandosi di ruolo
- ⤴ Esempio (da fare in MatCont):

$$\dot{x} = rx - x^2$$



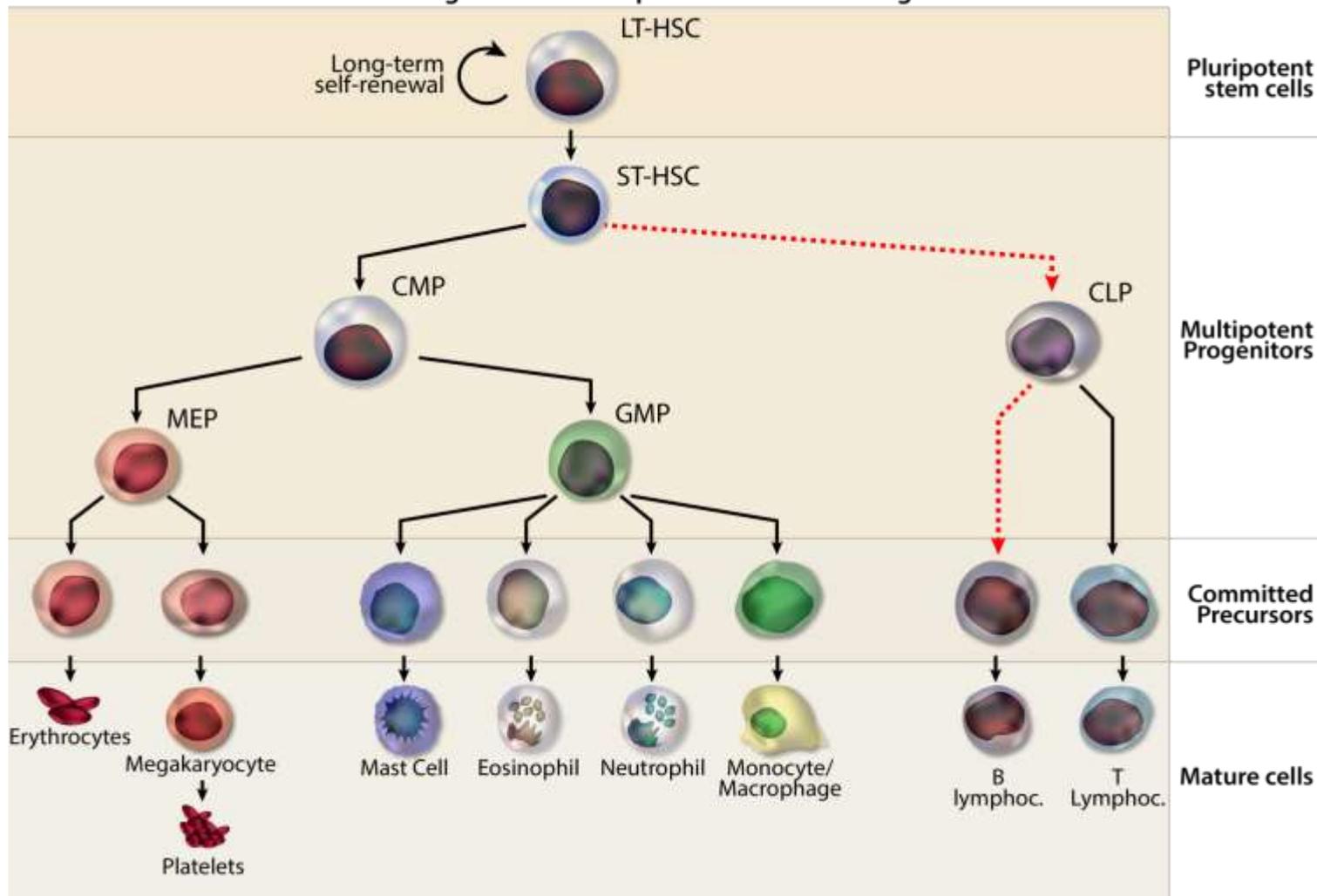
- ✦ L'origine è inizialmente l'unico p. di eq. stabile, poi diventa instabile e compaiono altri due p. di eq. Stabili
- ✦ Esempio (da fare in MatCont):

$$\dot{x} = rx - x^3$$

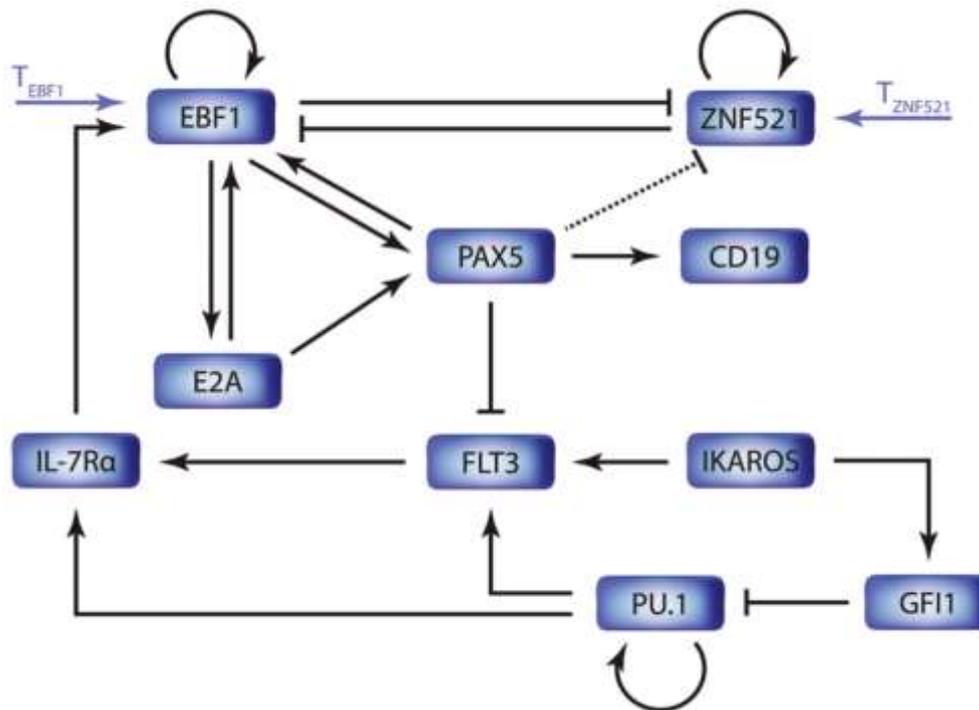


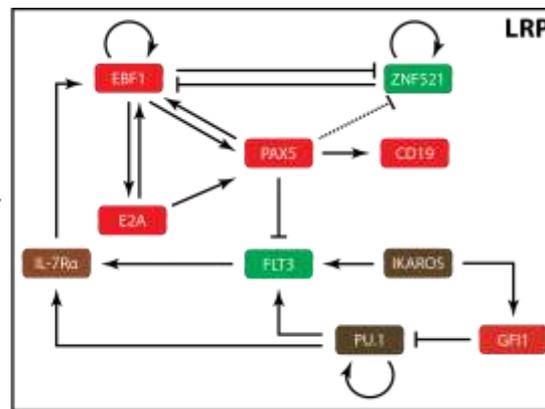
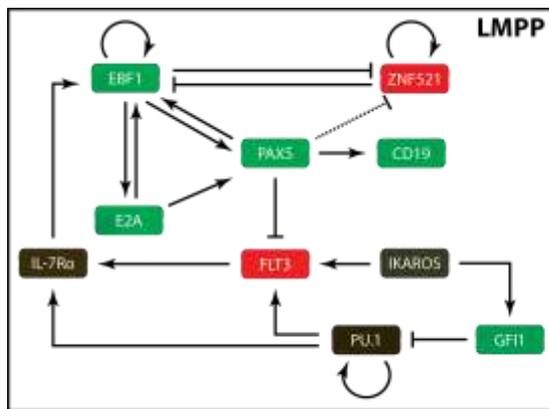
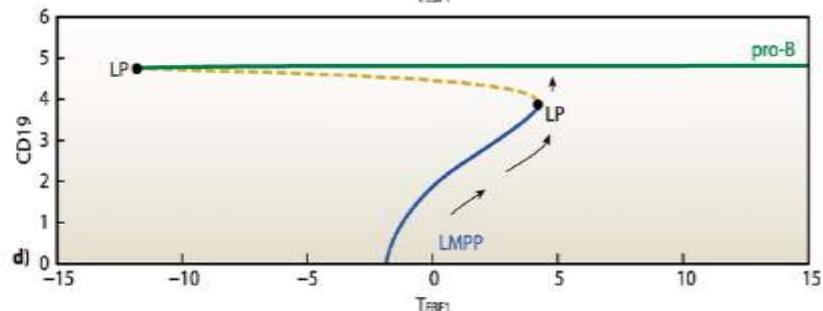
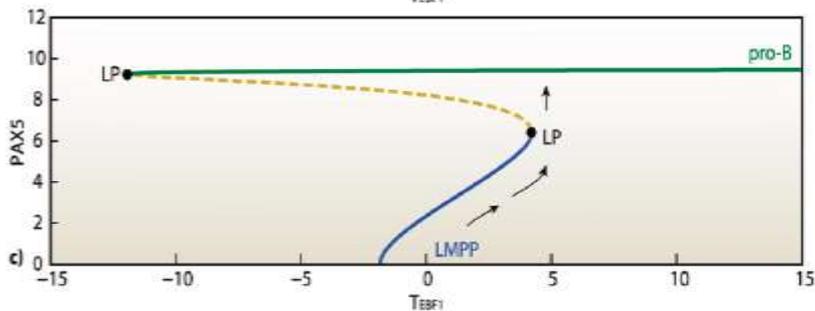
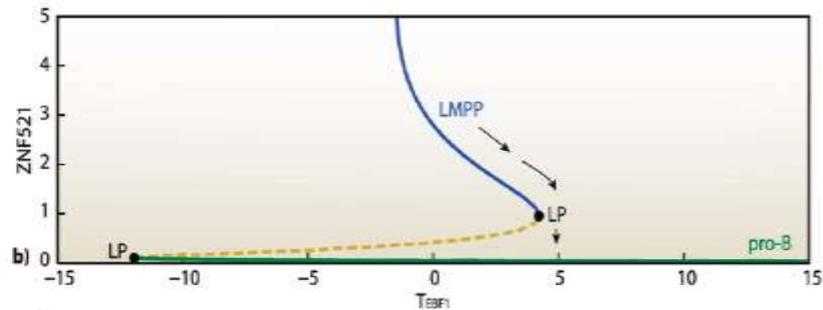
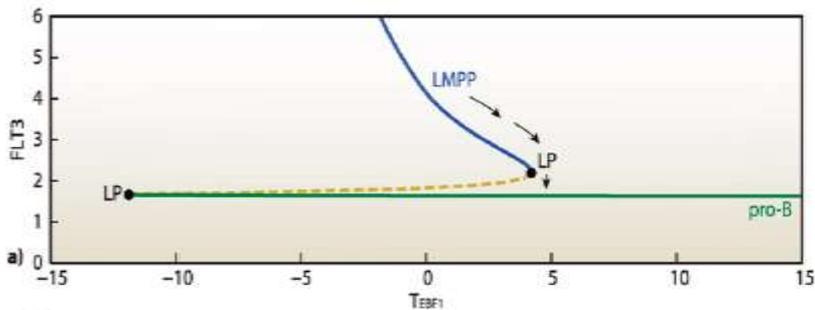
## Caso-studio 2: Studio della regolazione della differenziazione in cellule B

## Hierarchical decision making in the hematopoietic stem cell lineage

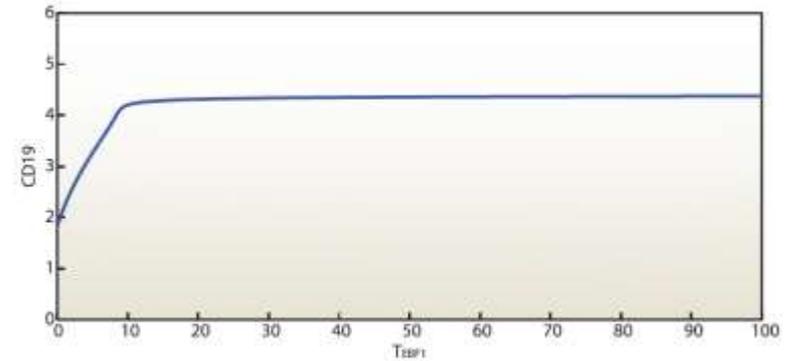
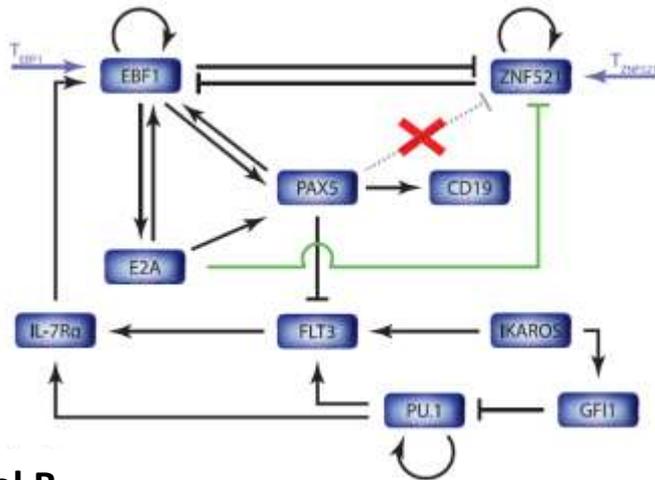


- Salerno L., Cosentino C., Morrone G., Amato F. Computational Modeling of a Transcriptional Switch Underlying B-Lymphocyte Lineage Commitment of Hematopoietic Multipotent Cells. (2015) PLoS ONE 10(7):e0132208.
- Il modello è stato ricavato dall'analisi della letteratura; **la regolazione negativa di ZNF521 da parte di PAX5 è una delle ipotesi testate utilizzando il modello**

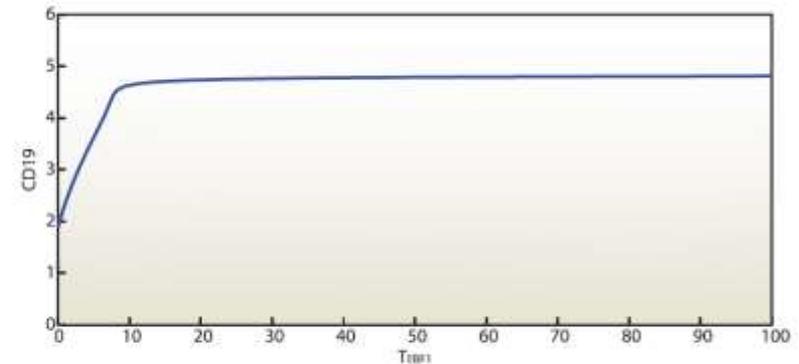
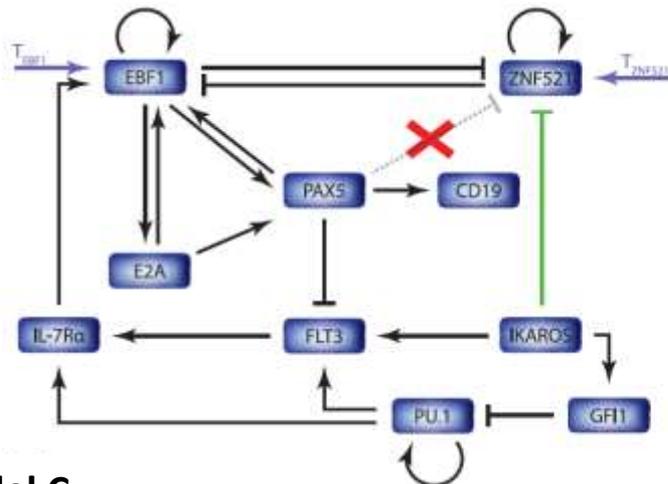




Low Expression  High Expression



Model B



Model C

- ✦ Quando ZNF521 è spento, lo switch è irreversibile
- ✦ Per valori intermedi di attivazione di ZNF521 si ha uno switch reversibile
- ✦ La differenziazione è comunque persistente
- ✦ Quando i livelli di attivazione di ZNF521 diventano molto elevati, la differenziazione non è più persistente
- ✦ In quest'ultimo caso, le cellule dovrebbero tornare allo stato indifferenziato al cessare dello stimolo che attiva EBF1

