

# Determinación de la influencia de la distribución espacial de kinasas de membrana sobre el tiempo de fosforilación de proteínas citosólicas

Campi, J. & Ferreiro, D.

## Introducción

En los organismos vivos hay muchos procesos que, aunque utilizados para fines distintos, están mediados por mecanismos comunes. Un ejemplo de esto es la activación o inactivación de procesos mediante la fosforilación de proteínas. Más específicamente, en las cascadas de transducción de señales hay varios puntos de regulación, en los que intervienen kinasas o fosfatasas (proteínas que agregan o quitan grupos fosfato respectivamente en determinados aminoácidos) que actúan sobre otras proteínas que forman parte de la cascada afectando su actividad, y con esto, la actividad de todas las demás proteínas que se encuentran río abajo.

Debido a la importancia que tienen las proteínas kinasas en las células que forman parte de un organismo y a la influencia que tiene, sobre muchos procesos, la fosforilación de una proteína, decidimos estudiar cómo afecta la distribución espacial de kinasas en la membrana plasmática a los tiempos de fosforilación de una dada proteína que parte del núcleo.

Para lograr esto comparamos la distribución de tiempos de fosforilación de cien proteínas para dos distribuciones espaciales de kinasas en la superficie de la membrana plasmática, manteniendo la concentración y actividad de kinasas constante.

## Métodos

El presente trabajo fue desarrollado completamente *in silico* utilizando el programa Matlab 7.0 para simular la trayectoria de las proteínas blanco y las distribuciones espaciales de kinasas en la membrana plasmática.

Para poder llevar esto a cabo, debieron hacerse algunas suposiciones acerca de ciertos aspectos de las células:

- La célula es esférica.
- El núcleo celular es una esfera contenida dentro de la célula.
- Las esferas correspondientes al núcleo celular y a la membrana plasmática son concéntricas.

- En la membrana plasmática hay *parches de fosforilación*, que son zonas en la membrana donde se encuentran las kinasas y por lo tanto, cuando la proteína entra en contacto con ellos, es fosforilada.
- Fuera de los parches de fosforilación no hay kinasas y por lo tanto las proteínas no pueden ser fosforiladas.
- Las proteínas se trasladan por difusión.
- Las proteínas no interactúan entre sí ni con ningún otro componente intracelular.

Con todo esto, se realizó una simulación en Matlab para calcular el tiempo que tardan cien proteínas que salen del núcleo en llegar a un *parche de fosforilación*. Dicha simulación se llevó a cabo para las dos distribuciones espaciales de kinasas. La manera que se implementó para mantener constantes la concentración y actividad de kinasas fue haciendo que éstas ocupen la misma superficie de la membrana en ambos sistemas. Esa superficie fue del 50% y se puede observar en la Figura 1.

La posición inicial de las proteínas blanco fue originada al azar sobre la superficie del núcleo, simulando que se traslocan del núcleo al citoplasma y a partir de dicha traslocación se comienza a medir el tiempo. Partiendo de la posición inicial la proteína comienza a difundir (realizar una caminata al azar) con las siguientes restricciones: no puede volver a ingresar al núcleo y no puede salir de la célula, es decir que sólo puede difundir en el citoplasma.

Se guardó el tiempo de fosforilación de cada proteína ( $n=100$ ) para cada uno de los dos sistemas.

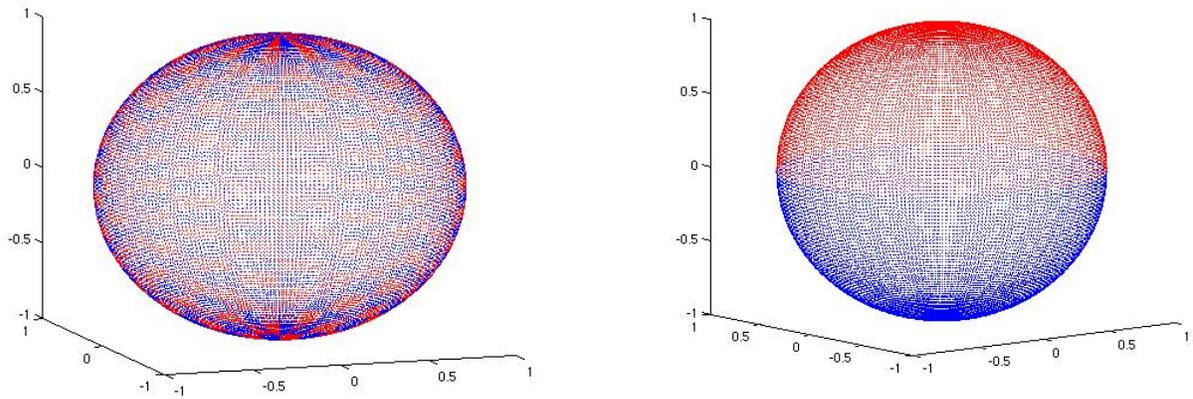
Se obtuvo un histograma con los tiempos de fosforilación para las dos distribuciones de parches y se procedió a compararlos mediante un test de Kolmogorov-Smirnov.

## Resultados

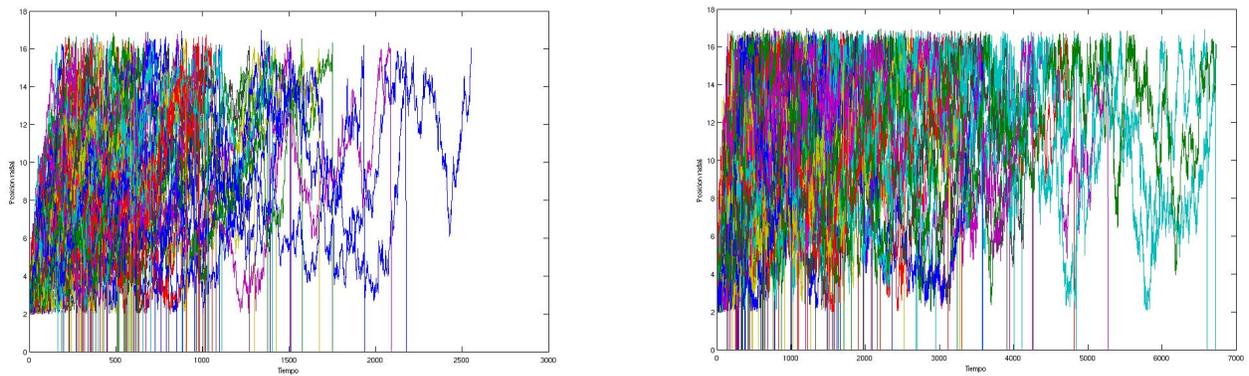
En la Figura 1 se muestran las dos esferas que representan a las membranas plasmáticas con las distintas distribuciones de kinasas en su superficie.

En la Figura 2 se graficó la posición radial de cada proteína en función del tiempo para cada sistema. Se puede observar que todas parten de la membrana nuclear ( $R_0=2$ ) y que la simulación de cada proteína termina cuando llega a la membrana plasmática ( $R_{\text{final}}=16$ ).

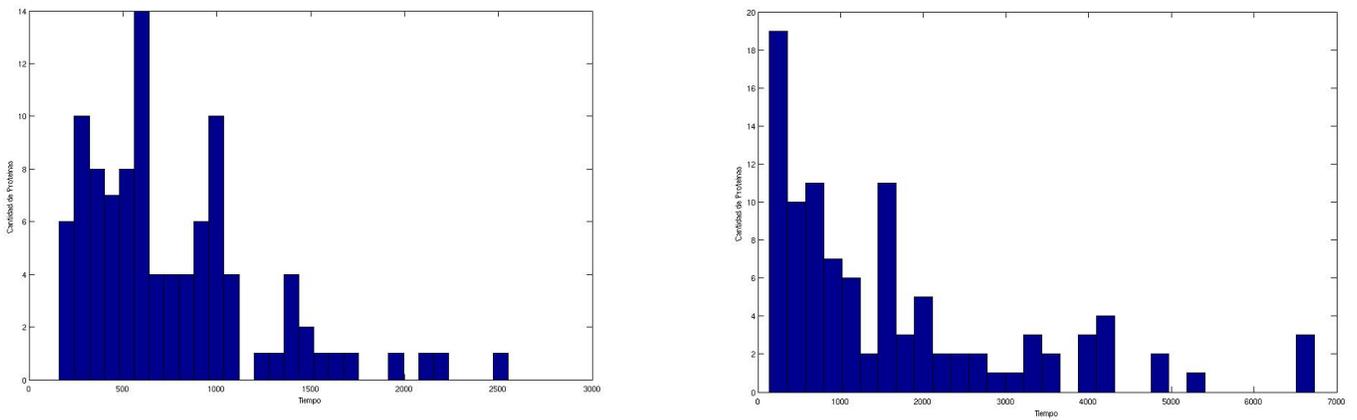
La figura 3 muestra los dos histogramas con las distribuciones de tiempo de fosforilación para los dos sistemas.



**Figura 1:** distribuciones de kinasas en la superficie de la membrana plasmática. Las zonas ocupadas por kinasas se muestran en rojo. Izq.) Distribución en parches. Der.) Distribución uniforme en una mitad de la célula.



**Figura 2:** posición radial en función del tiempo para las cien proteínas. Izq.) Distribución de kinasas en parches. Der.) Distribución uniforme de kinasas en una mitad de la célula.



**Figura 3:** histogramas con las distribuciones de tiempos de fosforilación para los dos sistemas. Izq.) Sistema con parches. Der.) Sistema con un solo parche.

La prueba de bondad de ajuste para las distribuciones de los histogramas también se realizó en Matlab, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras, con un  $\alpha$  del 5%. El valor p de la prueba obtenido fue de 0,6485.

## Discusión y conclusiones

Debido a que es difícil comparar los dos histogramas obtenidos con los tiempos de las dos distribuciones espaciales de kinasas, se realizó una prueba de bondad de ajuste para poder determinar si los histogramas provienen de distribuciones diferentes.

La hipótesis nula de la prueba plantea que la distribución es la misma para las dos muestras. La hipótesis alternativa, plantea que la distribución es diferente. Dado el valor p de la prueba obtenido (0,6485), no se rechaza la hipótesis nula.

Sin embargo, los histogramas a simple vista no son similares. Esto puede deberse a que un tamaño muestral de 100 no sea suficientemente grande para un muestreo adecuado del histograma.

Por otro lado, confiamos en que un tamaño muestral de 100, sea lo suficientemente grande como para compensar los cambios en los tiempos de fosforilación de cada proteína en particular, es decir, que si el tiempo aumenta para una proteína disminuya en la misma medida para otra (disminuye la varianza muestral).

Podemos concluir (con una confianza del 95%) que en nuestras condiciones experimentales la distribución espacial de kinasas en la membrana plasmática de la célula no afecta significativamente el tiempo de fosforilación de las proteínas.

El costo computacional de las simulaciones realizadas no nos permitió aumentar el n, pero dados los resultados obtenidos aventuramos que a medida que aumente el tamaño muestral los histogramas y sus distribuciones serán cada vez más similares.

Para confirmar estos resultados se deberían cambiar los motivos de los parches y la superficie total cubierta por los mismos.